

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



**INTEGRACIÓN DEL PROCESO KRAFT DE OBTENCIÓN
DE PASTA DE CELULOSA EN EL ESQUEMA DE UNA
BIORREFINERÍA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Raquel Martín Sampedro

Bajo la dirección de los doctores

Juan Carlos Villar Gutiérrez
Juan Antonio Martín Parra

Madrid, 2012

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**INTEGRACIÓN DEL PROCESO KRAFT DE OBTENCIÓN
DE PASTA DE CELULOSA EN EL ESQUEMA DE UNA
BIORREFINERÍA**

MEMORIA

**Que para optar al grado de Doctor
por la Universidad Complutense de Madrid presenta**

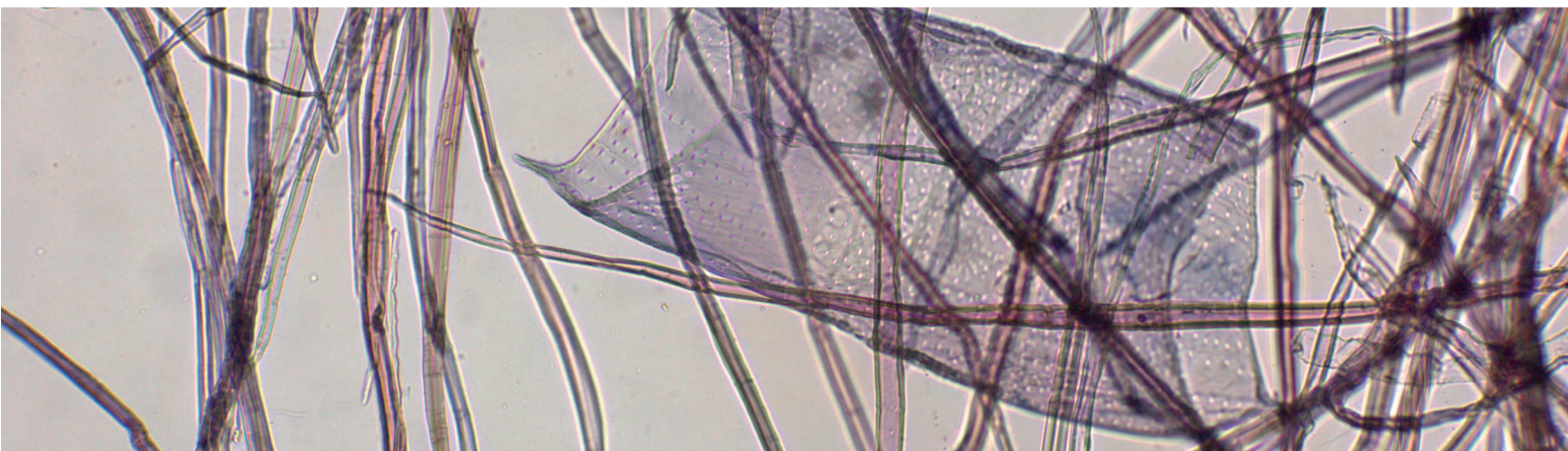
Raquel Martín Sampedro

Madrid, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

Laboratorio de Celulosa y Papel (CIFOR)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología
Agraria y Alimentaria (INIA)



INTEGRACIÓN DEL PROCESO KRAFT DE PRODUCCIÓN DE PASTA DE CELULOSA EN EL ESQUEMA DE UNA BIORREFINERÍA

RAQUEL MARTÍN

MADRID, 2011



Juan Carlos Villar Gutiérrez, Investigador del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), y Juan Antonio Martín Parra, Investigador Ramón y Cajal del mismo centro,

INFORMAN:

Que el trabajo de investigación recogido en la memoria titulada “Integración del proceso Kraft de obtención de pasta de celulosa en el esquema de una biorrefinería” ha sido realizado, bajo su dirección, por Raquel Martín Sampedro en los laboratorios de Celulosa y Papel del Centro de Investigación Forestal (CIFOR) perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos para optar al Grado de Doctor, autorizando su presentación en la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 29 de Agosto de 2011.

Juan Carlos Villar Gutiérrez

Juan Antonio Martín Parra

A los que siempre están

A mi familia

A Mario

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de alguna manera han contribuido en esta tesis, bien sea con su ayuda en el trabajo o mediante su apoyo incondicional. Sé que esta va a ser una de las partes de la tesis que más me cueste escribir, y no porque no tenga claro las personas a las que quiero agradecer o lo que quiero decirles, sino porque no sé si seré capaz de expresar con palabras la gratitud que siento.

En primer lugar, gracias a mis directores de tesis Dr. Juan Carlos Villar y Dr. Juan Antonio Martín. Gracias Juan Carlos por haber hecho posible que llevase a cabo este trabajo en el INIA y por haberme no sólo permitido, sino animado, a realizar estancias fuera del INIA, para poder completar así mi formación. En estos cuatro años he aprendido muchas cosas y directa o indirectamente han sido gracias a ti. Gracias por demostrarme tu confianza en mí para llevar a cabo los diferentes trabajos, experimentos, etc. En resumen, gracias por creer en mi como futura investigadora.

Gracias a los doctores Jiebing Li y Göran Gellerstedt del KTH (Suecia), Orlando Rojas y Ewellyn Capanema de NCSU (EEUU), Manuel Jesús Díaz y Juan Carlos García de la Universidad de Huelva, e Ilari Filpponen y Janne Laine de Aalto University (Finlandia). Gracias a todos ellos por la buena acogida en sus grupos de investigación, por su dedicación y paciencia y por todo lo que he aprendido con ellos. Quisiera expresar mi especial agradecimiento al Dr. Orlando Rojas, ya que él me ha acogido no una sino dos veces, tanto en NCSU como en Aalto University, guiándome siempre en mi trabajo con buenas ideas y atendiendo todas mis dudas con increíble rapidez. Sinceramente, no sé como puedes organizarte tan bien y abarcar todo el trabajo que llevas a cabo. Eres un ejemplo a seguir.

Gracias también a todas las personas que han sido mi familia, mis amigos y mis compañeros de trabajo en estas estancias. Gracias a David, Vivi, Cristiane y Helena en KTH; a Sole, Ingrid, Carlos, Ronalds y toda la banda en NCSU; a Quique, Minerva e Isabel en Huelva; y a Tiina, Laura, Xiaomeng, Ingrid y Sole (che! vosotras dos otra vez, y espero que coincidamos muchas más veces!) en Aalto. Sin todos vosotros no hubiese podido integrarme tan bien tanto dentro como fuera del laboratorio. Habéis hecho que

siempre tenga ganas de irme de estancia, y que la distancia de mis seres queridos sea mucho más llevadera.

Y por supuesto, gracias a mis compañeros del INIA. Gracias Esteban por tus ideas, tus reactores, tu ayuda, tu coche (jeje) y tu amistad. Gracias Chema por tener siempre un ratito para ayudarme, no solo a mí, sino a todos en el laboratorio, por estar siempre ahí para lo que necesitemos. Gracias Sara por tu sonrisa y por tus conversaciones, aunque hayamos trabajado poco juntas, creo que nos compenetraríamos muy bien. Y Luisa!! Aunque llegaste ya con mi tesis a la mitad espero que podamos seguir compartiendo laboratorio mucho tiempo, y sino, por lo menos sigamos compartiendo emails, cañas o lo que haga falta! Y gracias a todos los demás, a “los de arriba” Nuria, Reme, Ester y Carlos, a Serfaty, Ángela, Jesús, Pedro, etc. Todos, de una forma u otra, habéis puesto vuestro granito de arena.

Y como no, mil gracias a María. Gracias por tu ayuda y apoyo incondicionales, por tu alegría, tu sinceridad, tu compañerismo, y sobre todo gracias por tu amistad. Sabes que esta tesis no hubiese sido posible sin ti. Siempre has sacado tiempo de donde hiciese falta para ayudarme y aconsejarme, aunque tuvieses mil cosas más en la cabeza. Contigo he aprendido muchísimo y me has contagiado las ganas de investigar, de trabajar, de seguir en este mundillo. Sin duda puedo decir que estos 4 años no hubiesen sido lo mismo sin ti. No cambies nunca, y sobre todo, no dejes que te quiten esas ganas de aprender y de avanzar.

No se me olvidan mis compañeros de comidas en el INIA, gracias por las risas, el poder desconectar un rato del trabajo, por las cañas y las tapas. Gracias Juanan, Laura, Fede, David, Javi, Ana, etc. En estos cuatro años hemos pasado de mesas enormes a mesas para 2 o 3, como este verano, pero siempre ha seguido el contacto bien directo o por medio de otros. Espero poder celebrar con todos vosotros el ser Doctora!

Y gracias a mis amigos, porque la distancia física no siempre equivale a distancia sentimental. Gracias Gemma, Sara y Vero por vuestras visitas por el mundo, y a ti también Lolo! Pero tened cuidado con los trenes a Akala... que nunca se sabe cómo ni donde podéis acabar, incluso sin “my papers, my documentation!” jeje. Y a los que no habéis podido ir a visitarme, gracias también, porque siempre habéis estado ahí, gracias Judith (mi primilla) y todas mis niñas de Palencia.

Y de distancias saben mucho mis padres, que han aprendido a usar el skype y todo lo que haga falta sólo por estar siempre ahí conmigo, apoyándome en todo mi camino, tanto en los aciertos como en los errores. Gracias por todas y cada una de las pequeñas y grandes cosas que hacéis por mi y mis hermanos. Ah! y gracias por atreveros a volar e incluso a chapurrear inglés sólo por visitarme. Me alegra que gracias a esta tesis os hayáis animado a viajar más, y ahora ya no tenéis excusa para no seguir! Gracias también a mis hermanos, que siempre están ahí si los necesito, aunque sea con su apoyo silencioso. Y gracias también por haber elegido bien, y haberme dado dos cuñadas bien majas!

Y por último, gracias a ti, Mario. Gracias por ser como eres, por todo lo que haces por mí, por hacerme sentir feliz a cada momento. Gracias por las largas conversaciones a altas horas de la noche, las risas, los abrazos, la complicidad, etc. Gracias no sólo por no cortarme las alas, sino por volar conmigo. Tú sabes, casi mejor que yo, lo que necesito siempre. Te necesito a ti. ALB.

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1 - RESUMEN / ABSTRACT.....	1
2 - INTRODUCCIÓN	9
2.1 - Composición de la biomasa lignocelulósica	11
2.1.1 - Celulosa	13
2.1.2 - Hemicelulosa	14
2.1.3 - Lignina.....	16
2.2 - Procesos implicados en la fabricación de pastas Kraft.....	18
2.2.1 - Materias primas utilizadas	19
2.2.2 - Pasteado	21
2.2.3 - Blanqueo	25
2.3 - Concepto de biorrefinería.....	27
2.4 - Adaptación de un proceso Kraft al concepto de biorrefinería lignocelulósica.	32
2.4.1 - Extracción de hemicelulosas previa al pasteado Kraft	34
2.4.2 - Pre-tratamiento de explosión por vapor	36
2.5 - Biotecnología aplicada a la producción de pasta Kraft y bioetanol	41
2.5.1 - Biopulpeo	45
2.5.2 - Bioblanqueo.....	47
2.5.3 - Producción de bioetanol	49
3 - OBJETIVOS.....	53
4 - DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	57
4.1 - Cambios químicos y estructurales debidos al pre-tratamiento de explosión por vapor	62
4.1.1 - Cambios en la composición química	64

4.1.2 - Estudio termogravimétrico	68
4.1.3 - Cambios en las estructuras de lignina	70
4.1.4 - Análisis de la capacidad de retención de agua de las muestras	78
4.1.5 - Cambios de la porosidad relativa y área superficial	79
4.2 - Hidrólisis de las fracciones líquida y sólida generadas en el pre-tratamiento de explosión por vapor.	83
4.2.1 - Hidrólisis ácida y enzimática de la fracción líquida.....	84
4.2.2 - Hidrólisis enzimática de la fracción sólida.....	87
4.2.3 - Rendimiento global del proceso de hidrólisis enzimática	90
4.3 - Efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el pasteado Kraft y en el bioblanqueo.....	92
4.3.1 - Efecto del pre-tratamiento en el pasteado Kraft	93
4.3.2 - Efecto del pre-tratamiento en el bioblanqueo.....	100
4.4 - Combinación de tratamientos de explosión por vapor y LMS antes del pasteado como alternativa al biopulpeo con hongos	110
4.4.1 - Biopulpeo basado en explosión por vapor y tratamiento enzimático.....	111
4.4.2 - Biopulpeo con hongos ligninolíticos	116
4.4.3 - Comparación entre biopulpeo SE+LMS y biopulpeo fúngico	119
4.5 - Utilización de <i>Hesperaloe funifera</i> en el esquema de biorrefinería forestal planteado.....	121
4.5.1 - Caracterización de <i>Hesperaloe funifera</i>	122
4.5.2 - Pre-tratamiento de explosión por vapor	122
4.5.3 - Efecto del pre-tratamiento en el pasteado Kraft y en el biopulpeo de <i>H. funifera</i>	124
4.5.4 - Efecto del pre-tratamiento en el bioblanqueo de <i>H. funifera</i>	129
5 - CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	135
6 - TRABAJOS FUTUROS	143
7 - BIBLIOGRAFIA	147

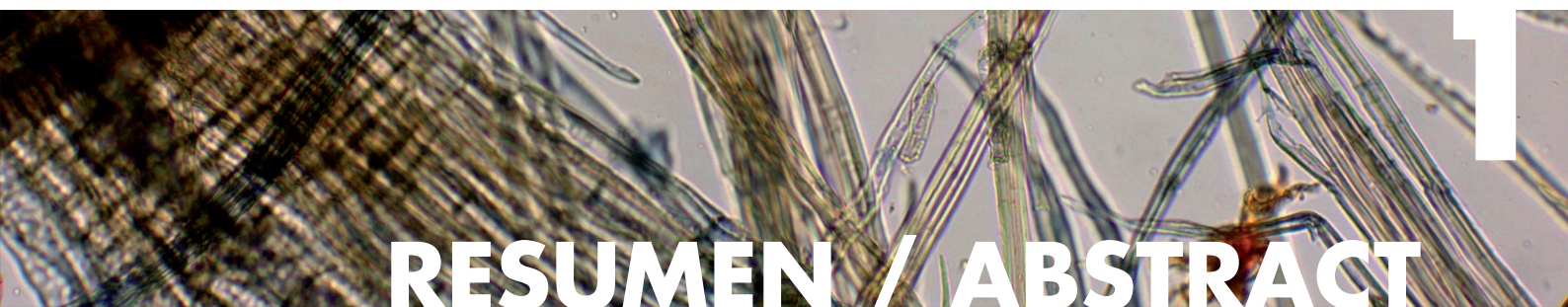
ANEXOS: Publicaciones	169
PUBLICACIÓN I:	171
PUBLICACIÓN II:	187
PUBLICACIÓN III:.....	199
PUBLICACIÓN IV:.....	227
PUBLICACIÓN V:	245
PUBLICACIÓN VI:.....	253
PUBLICACIÓN VII:.....	263

LISTA DE ABREVIATURAS

[A]	Concentración de monómeros
[AO]	Concentración de oligómeros
AA	Alcali activo
ABTS	2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico
AC	Extracción con acetona
AC + W	Extracción con acetona seguida de extracción con agua
AH	Hidrólisis ácida
Ar	Anillo aromático
BG	b-Glucosidasas
CBH	Celobiohidrolasas
CIFOR	Centro de Investigación Forestal
CMP	Pasteado químico-mecánico
Control+O₂ y NoSE	Pasta control sin pre-tratamiento de explosión por vapor deslignificada con oxígeno
CTMP	Pasteado químico-termo-mecánico
DC	Grado de condensación
E	Extracción alcalina
ECF	Secuencia de blanqueo libre de cloro elemental
ECN	Centro de Investigación Energética de los Países Bajos
EG	<i>Eucalyptus globulus</i>
EH	Hidrólisis enzimática
G	Unidad guayacilo de la lignina
H	Unidad 4-hidroxifenilo de la lignina
HBT	2-hidroxibenzotriazol
HMF	Hidroximetil furfural
HMQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear múltiple cuántica (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation)
HP	<i>Hesperaloe funifera</i>
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear simple cuántica (Heteronuclear Single Quantum Correlation)

IFPB	Biorefinería Integrada de Productos Forestales (Integrated Forest Product Biorefinery)
Ind	Pasta industrial
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Agrolimentaria
ISO	Organización Internacional de Normalización
L	Tratamiento enzimático con LMS
Lc	Tratamiento enzimático control sin adición de LMS
LCC	Complejo lignina - carbohidratos
LiP	Lignina peroxidasa
LM-NoO₂	Tratamiento enzimático con LMS sin adición de oxígeno
LMO₂	Tratamiento enzimático con LMS y oxígeno
LMS	Sistema laccasa - mediador
MnP	Manganeso peroxidasa
MWL	Milled Wood Lignin
nd	No disponible
N° Rev	Número de revoluciones
NoE	Muestras sin tratamiento de extracción
No-LMO₂	Tratamiento enzimático control sin adición de LMS ni oxígeno
NREL	Laboratorio Nacional de Energías Renovables del departamento de Energía de EEUU
OH_{ph}	Grupos hidroxilo fenólicos
OH_{pr}	Grupos hidroxilo primarios
OH_{sec}	Grupos hidroxilo secundarios
OMe	Grupos metoxilo
P	Blanqueo con peróxido de hidrógeno
Relación L/D	Relación longitud / diámetro
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rto	Rendimiento
S	Sulfidez
S	Unidad siringilo de la lignina
S₀	Factor de severidad del tratamiento de explosión por vapor
SE	Explosión por vapor (steam explosion)

SEi	Tratamiento “i” de explosión por vapor de Eucalyptus globulus
SEi’	Tratamiento “i” de explosión por vapor de Hesperalo funifera
SEM	Microscopio de barrido electrónico
°SR	° Schopper - Riegler
T	Temperatura
t	Tiempo
TCF	Secuencia de blanqueo totalmente libre de cloro
TGA	Análisis termogravimétrico
UA	Unidades de actividad
W	Extracción con agua
X	Tratamiento con xilanasa
XL	Tratamiento en serie con xilanasa y lacasa



RESUMEN / ABSTRACT

1. RESUMEN / ABSTRACT

El concepto de biorrefinería se basa en el uso eficiente de la biomasa lignocelulósica como materia prima en la producción integrada de combustibles, energía y productos químicos. En una biorrefinería lignocelulósica se busca fragmentar un material con alto contenido en celulosa, como paja, madera o residuos de papel, en tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, y obtener a partir de ellos distintos productos: combustibles, productos químicos, bio-polímeros y otros.

Basándonos en este concepto, una fábrica de pastas celulósicas podría convertirse en una biorrefinería en la que, además de pasta de celulosa, se obtendrían otros productos como etanol, bio-polímeros y otros compuestos químicos. En una fábrica Kraft convencional, la mayor parte de las hemicelulosas y de la lignina presente inicialmente en la madera son extraídas por la lejía de cocción y llevadas a la caldera de recuperación donde se queman para producir vapor y electricidad y recuperar los reactivos de cocción. Estos componentes suponen en su conjunto casi un 50% del peso de la madera y mientras la lignina tiene un alto poder calorífico, las hemicelulosas solo aportan la mitad de energía que aquella. Por ello, éstas podrían utilizarse para obtener etanol o compuestos de mayor valor añadido que aumenten la rentabilidad de la fábrica. Para conseguir dicho objetivo, sería necesaria una pre-extracción de las hemicelulosas previa al pasteado químico, que permita su recuperación sin degradación y su utilización en la síntesis de otros productos.

Dentro de este esquema se sitúa la presente tesis doctoral, cuyo objetivo principal es estudiar y evaluar la posible integración del proceso de pasteado Kraft en una biorrefinería lignocelulósica. Para ello se aplicó como método de extracción de hemicelulosas un proceso de explosión por vapor (SE) previo al pasteado químico de *Eucalyptus globulus*. Comparado con otros métodos, la explosión por vapor no utiliza reactivos químicos, evitando los costes de recuperación y/o neutralización y disminuyendo el impacto ambiental. Además, como se comprobó en esta tesis doctoral, proporciona una fracción sólida con una estructura más abierta (mayor volumen de macroporos y mayor capacidad de retención de agua), que facilitará la difusión de los reactivos durante el pasteado. Por otro lado, tras el pre-tratamiento SE, se observó una disminución del contenido en enlaces β -O-4 en la lignina presente en la fracción sólida, debido a reacciones de despolimerización. Sin embargo, se produjeron también

reacciones de repolimerización, cuyo resultado fue la presencia de lignina condensada en dicho sólido. Por último, se observó una extracción del 47% de los xilanos, mientras el contenido en celulosa del sólido se mantuvo prácticamente inalterado.

Con objeto de evaluar el potencial de la corriente de hemicelulosas extraídas durante el pre-tratamiento SE para su uso como fuente de azúcares en la producción de bioetanol, se sometió dicha corriente a hidrólisis enzimática e hidrólisis ácida. Se obtuvieron mejores rendimientos mediante hidrólisis enzimática (conversión a azúcares del 83% de los xilooligosacáridos en la fracción líquida). Además, se evaluó por otro lado la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas, planteando la producción de bioetanol como alternativa a la producción de pastas. Se observó que el rendimiento de la hidrólisis aumentaba al aumentar la intensidad del pre-tratamiento de SE. Sin embargo, para optimizar el proceso global, se debe tener en cuenta también el aprovechamiento de la corriente líquida de hemicelulosas, que se ve perjudicado al aumentar la intensidad del pre-tratamiento ya que provoca la degradación de la hemicelulosa en el líquido y la generación de compuestos inhibidores de las etapas consecutivas de hidrólisis y fermentación. Por ello, la aplicación de un pre-tratamiento SE no muy severo (como los llevados a cabo en esta tesis) puede ser una buena opción para aumentar el rendimiento global del proceso. Además, la aplicación de un tratamiento con sistema lacasa mediador (LMS) antes de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida mejoró el rendimiento de obtención de glucosa, debido probablemente a la eliminación de compuestos fenólicos inhibidores. A pesar de estas mejoras, la cantidad de azúcares obtenidos a partir de la fracción sólida sólo representó el 12,3% del peso de la materia prima original. Este dato, junto con el alto precio actual de la pasta Kraft, señaló el pasteado Kraft como la mejor opción para aprovechar la fracción sólida obtenida en el pre-tratamiento de explosión por vapor.

El estudio del pasteado Kraft mostró un aumento en la deslignificación del 70%, debido a la mejor difusión de los reactivos de cocción dentro de la fracción sólida pre-tratada mediante SE. De esta forma, el tiempo de cocción pudo reducirse en un 60% para obtener pastas con una calidad similar a la comercial, permitiendo un aumento de la productividad de la fábrica. Debido a la eliminación de hemicelulosas durante este pre-tratamiento, la energía consumida por las pastas durante el refino fue mayor y las propiedades mecánicas ligeramente inferiores a las de la pasta control. Sin embargo, las propiedades ópticas fueron mayores, mostrando mayor blancura y menor índice de

amarilleamiento, además de menor contenido en ácidos hexenurónicos. Por otro lado, al someter estas pastas pre-tratadas a una secuencia de bioblanqueo LEP (siendo L el tratamiento LMS, E la extracción alcalina y P el blanqueo con peróxido de hidrógeno) se observó una mayor blanqueabilidad de las mismas, obteniéndose pastas con menor número kappa, mayor blancura y mejores propiedades colorimétricas que las pastas bioblanqueadas control (sin pre-tratamiento SE). Además, se redujo el consumo de peróxido de hidrógeno en un 20%. Por tanto, las pastas obtenidas mediante este esquema de biorrefinería (SE+Kraft+bioblanqueo) podrían utilizarse para aplicaciones en las que las propiedades ópticas sean importantes y no se necesite una gran resistencia mecánica, consiguiendo además reducir el tiempo de cocción y el consumo de reactivos químicos y obteniendo como subproducto una corriente rica en hemicelulosas.

Por otro lado, el pre-tratamiento de explosión por vapor mejoró la accesibilidad de las astillas, como se ha comentado previamente, haciendo más eficaz la aplicación de un tratamiento enzimático LMS previo al pasteado Kraft. Mediante esta forma de biopulpeo, se evitan los inconvenientes de la aplicación industrial de biopulpeo con hongos ligninolíticos, como son los largos tiempo de tratamiento y la pérdida de rendimiento debido a la degradación de carbohidratos. Aplicando dicho LMS sobre las astillas pre-explosionadas, se obtuvo un incremento en la deslignificación del 13,9% y una reducción en el consumo de reactivos (12% y 6% para Na₂S y NaOH respectivamente) comparado con el proceso sin pre-tratamiento enzimático.

Por último, se evaluó el uso de *Hesperaloe funifera*, especie no maderera con alto potencial papelero, en el esquema de biorrefinería planteado. Para ello se llevo a cabo un pre-tratamiento SE seguido de un biopulpeo y bioblanqueo, esperando una mayor eficacia de las etapas enzimáticas (LMS) debido a la estructura menos compacta del *H. funifera* comparado con *E. globulus*. Mediante el pre-tratamiento se extrajo el 57% de los xilanos del material original y se obtuvieron pastas Kraft de calidad similar a las obtenidas a partir de *E. globulus*. Además, el consumo de reactivos durante el pasteado se redujo comparado con el control sin SE. Sin embargo, el efecto de la SE en la deslignificación durante el pasteado fue menor que el observado para *E. globulus*. Por otro lado, el tratamiento LMS durante el biopulpeo no proporcionó las ventajas esperadas, pero sí lo hizo al aplicarlo en el bioblanqueo. Así, durante el bioblanqueo se observó un aumento en la deslignificación debido a la SE y al LMS y una reducción del consumo de peróxido de hidrógeno del 25%.

ABSTRACT

The concept of a forest biorefinery is based on the effective use of lignocellulosic biomass as feedstock in the integrated production of fuels, energy and chemical products. In a lignocellulosic biorefinery, a raw material with high cellulose content, such as straw, wood or paper residues, is fragmented into three main components: cellulose, hemicelluloses and lignin, that will be converted into different products: fuels, chemical products, bio-polymers and others.

Based on this concept, a chemical pulp mill could be transformed into a forest biorefinery, where ethanol, bio-polymers and other chemical products could be produced in addition to pulp. In a conventional Kraft pulp mill, most of the hemicelluloses and lignin present in the wood initially are extracted by the cooking liquor and burned in the recovery boiler to produce steam and electricity and to regenerate the pulping chemicals. These compounds represent about 50% of the wood weight, and while lignin has a high heating value, hemicelluloses only provide half the energy that lignin does. Therefore, the hemicelluloses could be used to produce ethanol or other high value-added products, increasing the total revenue stream for the pulp mill. To achieve this goal, the hemicelluloses should be extracted from wood prior to pulping, allowing for their recovery without degradation and their utilization in the synthesis of other products.

This is the context that frames the present doctoral thesis, whose main objective is to study and to evaluate the potential integration of the Kraft pulping process into a lignocellulosic biorefinery. To this end, a steam explosion process (SE) was used as method for hemicelluloses extraction prior to chemical pulping of *Eucalyptus globulus*. Compared to other methods, steam explosion does not use chemical reagents, avoiding the recovery and/or neutralization costs and reducing the environmental impact. Furthermore, as it has been proved in this doctoral thesis, this method yields a solid fraction with a more open structure (greater macropore volume and increased water retention capacity) that might favor an efficient diffusion of cooking liquor into the fibers during pulping. On the other hand, depolymerization reactions led to a decrease in the β -O-4 structure of the lignin remaining in the solid fraction after the SE pre-treatment. Nevertheless, repolymerization reactions also took place, resulting in the

presence of condensed lignin in the solid fraction. Finally, a 47% of the wood xylan was extracted, while the cellulose content remained almost constant.

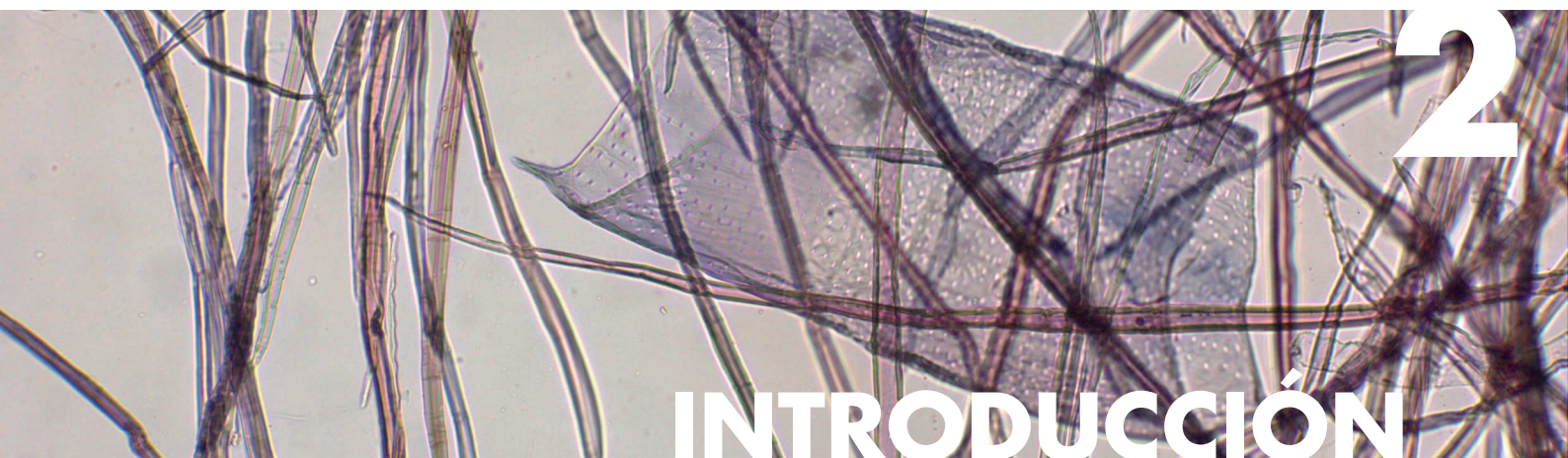
To assess the potential of the hemicelluloses extracted in the SE pre-treatment to be used as a source of sugar for the production of bioethanol, this liquid fraction was subjected to enzymatic and acid hydrolysis. The best yield was obtained by enzymatic hydrolysis (83% of the xylooligosaccharides in the liquid fraction were converted to sugars). In addition, the enzymatic hydrolysis of the solid fractions was also evaluated, considering the bioethanol production as an alternative to pulp production. It was observed that the hydrolysis yield increased with the severity of the SE pre-treatment. However, to optimize the overall process, it should also be taken into account the utilization of the hemicelluloses liquid current. And, when the severity of the pre-treatment increases, so does the degradation of hemicelluloses and the generation of inhibiting compounds, which reduces the yields of the subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation stages. Therefore, the use of a mild SE pre-treatment (like those applied in this thesis) can be a good option to increase the overall yield of the process. Moreover, the application of a laccase mediator system (LMS) treatment before the enzymatic hydrolysis of the solid fractions increased the glucose yield, likely as a consequence of the removal of inhibiting phenolic compounds. Despite these improvements, the amount of sugars obtained from the solid fraction represented only a 12.3% of the original raw material weight. This finding, and the current high price of Kraft pulp, makes Kraft pulping stand out as the best option to exploit the solid fraction obtained in the SE pre-treatment.

The study of the Kraft pulping process showed an increase in delignification by up to 70% caused by a more efficient diffusion of cooking liquor into the SE pre-treated solid fraction. Thus, the cooking time could be shortened by 60% obtaining pulps of a quality similar to commercial standards, and allowing an increase in the production rate. Due to the removal of hemicelluloses in the pre-treatment, the exploded pulp required more energy during refining and the mechanical properties were slightly worse than those of the control pulp. However, the optical properties were better, showing higher brightness and a smaller yellowness index, as well as less hexenuronic acid content. Moreover, when these pulps were subjected to a LEP biobleaching sequence (L standing for LMS treatment, E for alkaline extraction, and P for hydrogen peroxide bleaching), exploded pulps proved to have more bleachability. Thus, biobleached

exploded pulps had lower kappa number, higher brightness and better colorimetric properties than the biobleached control pulp (without SE pre-treatment). In addition, there was a reduction in hydrogen peroxide consumption of 20%. Therefore, pulps obtained by this biorefinery process (SE+Kraft+biobleaching) could be used in applications for which optical properties are important but not so mechanical strength, achieving also a reduction in cooking time and chemical consumption and obtaining as a byproduct a liquid current rich in hemicelluloses.

On different note, the steam explosion pre-treatment improved the accessibility of chips, as mentioned previously, and consequently, the implementation of a LMS enzymatic treatment prior to Kraft pulping was more effective. This biopulping process avoided some of the drawbacks of the industrial application of biopulping using ligninolytic fungi, such as long treatment times and yield loss due to degradation of carbohydrates. Applying this LMS treatment to pre-exploded chips, an increase in the delignification of 13.9% and a reduction in the chemical consumption (12% and 6% of Na₂S and NaOH respectively) were achieved compared to the same process without enzymatic treatment.

Finally, *Hesperaloe funifera*, a non-wood material with high potential in pulp and paper applications, was evaluated as feedstock for the biorefinery process proposed in this doctoral thesis. To this end, a SE pre-treatment followed by biopulping and biobleaching was carried out, expecting that the relatively less compact structure of *H. funifera*, compared with *E. globulus*, would results in higher efficiency of the enzymatic steps (LMS). The SE pre-treatment allowed for the extraction of 57% of the xylan present in the raw material, leading to Kraft pulps of a quality similar to that of *E. globulus*. Furthermore, chemical consumption during the pulping process was reduced compared to the control process without SE pre-treatment. However, the effect of the SE pre-treatment in terms of delignification during pulping was smaller than that observed for *E. globulus*. On the other hand, the LMS treatment in biopulping did not result in the expected benefits, but did so when applied in biobleaching. Thus, the combination of SE and LMS led to an increase in delignification during biobleaching and a reduction in hydrogen peroxide consumption by up to 25%.



2

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 - Composición de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica está formada básicamente por tres componentes principales (celulosa, hemicelulosa y lignina) junto con otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular como son los extractivos y los compuestos inorgánicos. Estos compuestos minoritarios representan el 4-10% del peso seco, e incluyen diferentes grasas, terpenos, alcaloides, proteínas, fenoles, pectinas, gomas, resinas, etc., cuyas proporciones y composición dentro de un mismo tipo de material varían en función de la edad, estado de crecimiento u otros factores.

La proporción de los diferentes componentes principales de la biomasa lignocelulósica varía con el tipo de planta, la edad o la parte del tejido vegetal de donde provengan (Fengel y Wegener, 1989). En la tabla 2.1 se muestra la composición típica de diferentes especies lignocelulósicas.

Tabla 2.1. Composición química porcentual de algunas especies lignocelulósicas (% en peso)

Lignocelulosa	Extractos	Lignina	Celulosa	Xilanos	Mananos	Arabanos
Abeto ¹	9,6	27,1	41,9	6,1	14,3	1,2
Pino ¹	10,8	27,5	37,7	4,6	7,0	nd
Abedul ²	4,8	22,8	38,2	18,5	1,2	nd
Álamo ²	nd	18,1	49,9	17,4	4,7	1,8
Eucalipto ³	2,8	31,3	45,0	14,1	3,1	2,0
Arce ³	3,2	25,4	42,0	22,1	3,1	3,7
Paja de trigo ⁴	15,3	18,1	37,8	22,8	0,3	1,6
Paja de cebada ⁵	nd	16,1	33,1	20,2	nd	3,8

nd: no disponible

¹ Hayn et al. (1993)

² Wiselogle et al. (1996)

³ Henriksson et al. (2007)

⁴ Perez et al. (2008)

⁵ Garcia-Aparicio et al. (2006)

La pared celular de los materiales lignocelulósicos está compuesta por multitud de filamentos enrollados helicoidalmente con relación al eje de la célula (macrofibrillas); estas macrofibrillas son agregados de unos 250 filamentos más finos

denominados microfibrillas y constituidos a su vez por unas 20 fibrillas elementales. Las fibrillas elementales están formadas por entre 40 y 100 largas cadenas de celulosa simples, dispuestas paralelamente, que se unen transversalmente entre sí por enlaces tipo puente de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

En la pared celular se distinguen la pared primaria (P) y la pared secundaria (Figura 2.1). Las paredes primarias de dos células adyacentes están unidas entre sí por lignina, denominándose a esta capa de unión laminilla media (LM). La cavidad interior de la célula se llama lumen y conecta unas células con otras formando el tejido conectivo. La pared secundaria está constituida por tres capas que se diferencian en la orientación de las fibrillas de celulosa. En las capas exterior e interior (S_1 y S_3) las fibrillas están dispuestas formando un amplio ángulo con el eje de la célula, mientras que la disposición de las fibrillas en la capa intermedia gruesa (S_2) es prácticamente paralela al eje. Algunas especies madereras (principalmente algunas coníferas) tienen una capa adicional sobre S_3 en forma de revestimiento interior con irregularidades a modo de verrugas (capa verrugosa V).

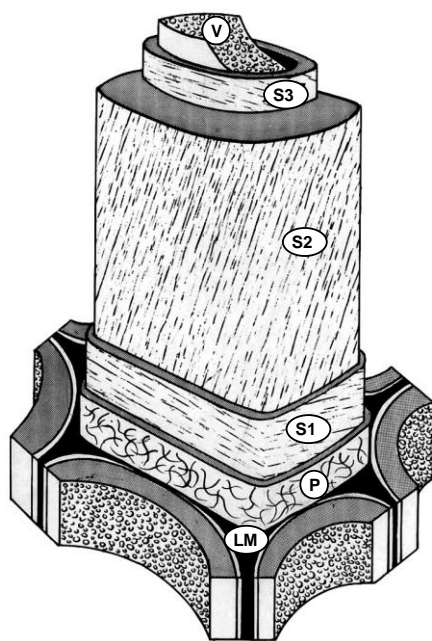


Figura 2.1. Capas de la pared celular de las fibras vegetales. (Côte, 1977)

Los tres componentes principales de la biomasa (celulosa, lignina y hemicelulosa) se encuentran presentes en las distintas capas de la pared celular, aumentando el contenido en lignina y disminuyendo el contenido en celulosa al ir de las

capas interiores a las exteriores. En la figura 2.2 se muestra una representación esquemática de la disposición y uniones entre los principales constituyentes de la pared secundaria, pudiendo observarse las microfibrillas de celulosa inmersas en una matriz de lignina en la que también está presente la hemicelulosa.

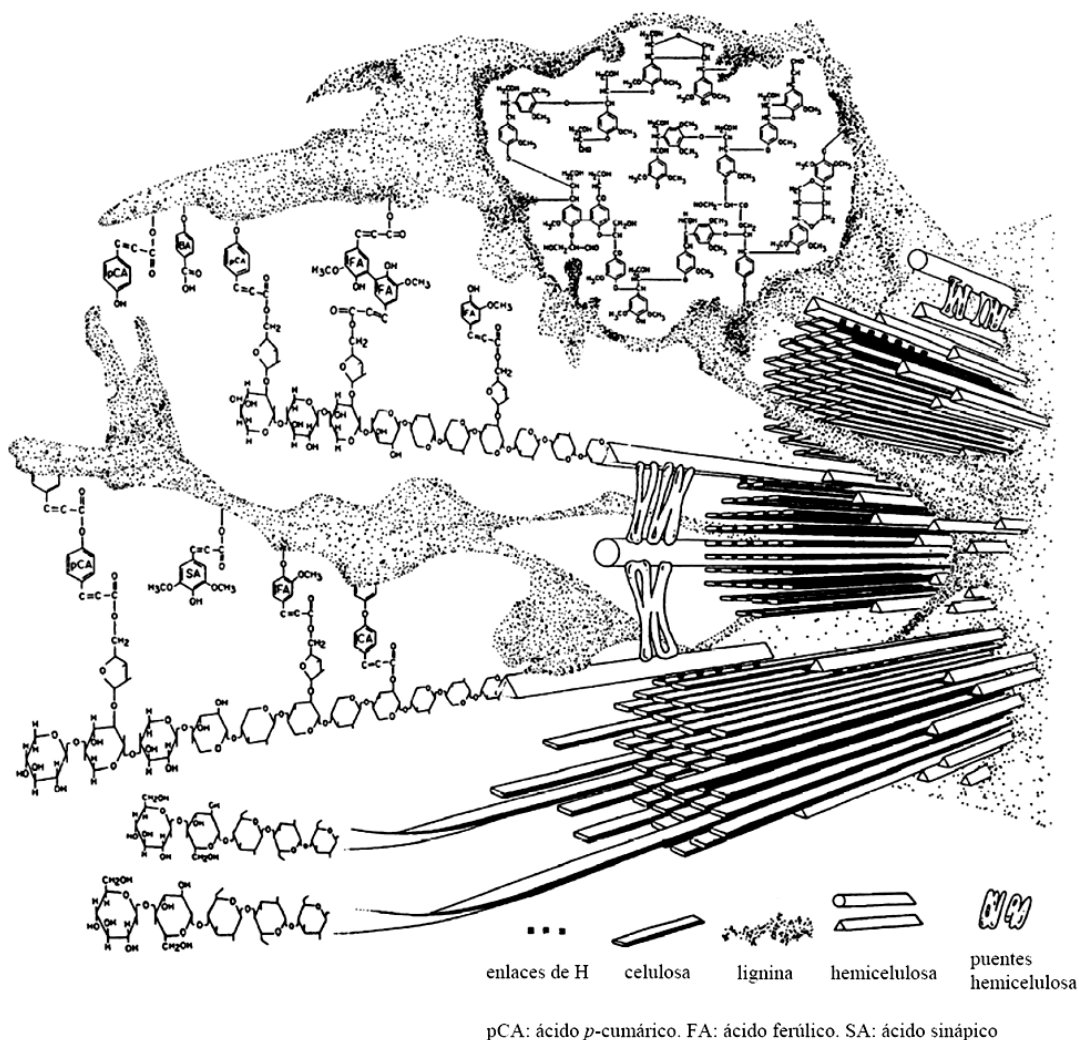


Figura 2.2. Representación esquemática de las relaciones entre los principales constituyentes de la pared secundaria (celulosa, lignina y hemicelulosa) de una angiosperma herbácea. Las uniones entre estos polímeros se completan mediante puentes intermoleculares formados por los ácidos *p*-hidroxicinámicos (Bidlack et al., 1992).

2.1.1 - Celulosa

La celulosa es el constituyente principal de la pared celular vegetal y representa entre un 40 a 46% en madera de coníferas, entre un 41 a un 50% en madera de frondosas y entre un 40 a 60% en especies no madereras (Aitken et al., 1988). Es un biopolímero homogéneo lineal, muy regular, constituido por cadenas lineales de D-

glucosa unida mediante enlaces β -(1 \rightarrow 4) para formar la molécula de celobiosa, el disacárido que representa la unidad constitutiva de la celulosa.

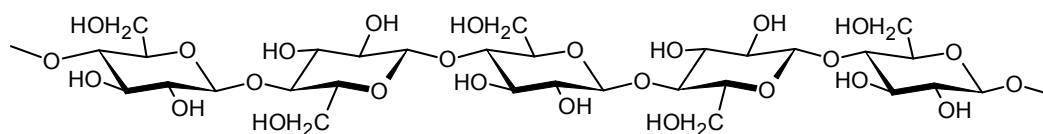


Figura 2.3: Esquema de la cadena de celulosa.

El grado de polimerización de la celulosa en la madera oscila entre 7.000 y 14.000. La unión de estas macromoléculas alterna la sucesiva formación de regiones cristalinas y regiones amorfas. En las zonas cristalinas, inaccesibles a los reactivos químicos, las cadenas de celulosa se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. En las regiones amorfas, la disposición de las moléculas es menos compacta, y la unión entre las cadenas es menor que en las regiones cristalinas. La fracción amorfa es la más accesible al agua y a los agentes químicos, siendo por tal razón la más reactiva. Es importante señalar la existencia de grupos H-C-OH y $\text{H-C-CH}_2\text{OH}$, en el polímero de celulosa, los cuales dado su carácter polar condicionan las relaciones entre el agua y la madera (Aitken et al., 1988; Higuchi, 1990; Peraza et al., 1993). Las diferencias en el grado de polimerización y peso molecular también influyen en el comportamiento de la celulosa frente a diferentes reactivos químicos o enzimas.

Además, el componente celulósico del tejido vegetal se encuentra embebido en una matriz formada por hemicelulosa y lignina, estando por tanto, protegido del ataque enzimático y químico. Esta resistencia, unida al alto grado de organización de la celulosa, que aporta resistencia química y mecánica, es la causa de que este polímero sea el material estructural de las plantas.

2.1.2 - Hemicelulosa

La hemicelulosa actúa junto con la lignina como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular, por tanto se encuentra unida tanto a celulosa como a lignina por distintos tipos de enlace. Son un grupo de polisacáridos bien diferenciados de la celulosa, fácilmente extraíbles con álcali y mucho menos resistentes a la hidrólisis que la celulosa (Tenkanen et al., 1995). A diferencia de la celulosa, son heteropolímeros que pueden estar ramificados con mono-, di- u

oligosacáridos de cadena corta, dando lugar a una estructura no cristalina. Su grado de polimerización es mucho menor que el de la celulosa y varía entre 70 y 200, con valores medios de 150.

Estos polisacáridos ramificados están formados por una cadena lineal de monosacáridos unidos principalmente por enlaces β -(1 \rightarrow 4) (en el caso de la D-galactosa: β -(1 \rightarrow 3)), a la cual se unen cadenas laterales cortas a menudo de azúcares distintos a los de la cadena principal. Los residuos de monosacáridos incluyen pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-ramnosa y L-fucosa) y ácidos urónicos (ácido D-glucurónico y ácido D-galacturónico), que pueden encontrarse acetilados o en forma de ésteres metílicos. Las hemicelulosas, al igual que la celulosa, presentan grupos H-C-OH, por lo que tienen carácter hidrófilo. (Aitken et al., 1988; Peraza et al., 1993).

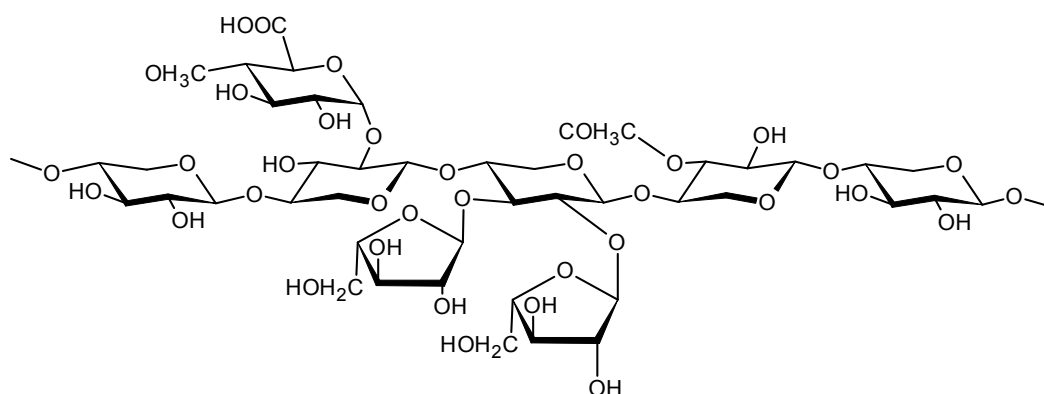


Figura 2.4. Esquema de la estructura de las hemicelulosas.

Mientras que la estructura de la celulosa es la misma en los diferentes tipos de madera y otros materiales lignocelulósicos, en las hemicelulosas existe una considerable variación entre las diferentes maderas. En las frondosas se encuentran principalmente hemicelulosas con unidades de cinco carbonos (pentosas), principalmente xilanos, con numerosos por grupos acetilo en su estructura, y representan entre un 20 y 35% de la masa total de la madera (Dahlman et al., 2003; Fengel y Wegener, 1989). En cambio, en las coníferas abundan más las hemicelulosas con unidades de seis carbonos (hexosas), principalmente manosas (glucomananos), representando entre un 25 y 30% de la masa total (Dahlman et al., 2003). Las plantas herbáceas presentan, al igual que las maderas de frondosas, un mayor porcentaje de pentosanos, pero presentando menor proporción de grupos acetilo (Fengel y Wegener, 1989).

2.1.3 - Lignina

La lignina representa entre un 25 y 31% de la biomasa de las maderas de coníferas, entre un 17 y 26% de las maderas frondosas y entre un 7 y 21% de las especies no madereras (Aitken et al., 1988). La lignina es un polímero heterogéneo complejo, de naturaleza fenilpropanoide, covalentemente asociado a la celulosa, las hemicelulosas y las proteínas. Es un biopolímero tridimensional amorfo, aunque algunos autores han descrito cierta ordenación tridimensional (Faulon et al., 1994), cuya naturaleza aromática y baja proporción de grupos polares le confiere carácter hidrófobo. Se sintetiza por la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes aromáticos de tipo fenilpropano, denominados alcoholes cinamílicos. Estos alcoholes (figura 2.5) se diferencian entre sí por las distintas sustituciones que presenta el anillo aromático: alcohol p-cumarílico que no presenta ningún sustituyente y que va a dar lugar a las unidades 4-hidroxifenilo de la lignina (unidades H); el alcohol coniferílico, que presenta un grupo metoxilo en la posición 3 del anillo aromático y que va a dar lugar a las unidades guayacilo de la lignina (unidades G); y el alcohol sinapílico, que presenta sustituidas las posiciones 3 y 5 del anillo aromático con sendos grupos metoxilos y que dará lugar a las unidades siringilo de la lignina (unidades S).

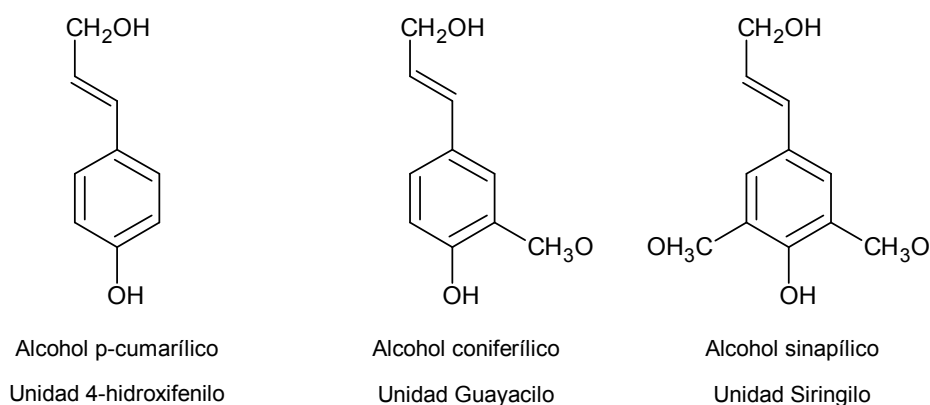


Figura 2.5. Monómeros precursores de la lignina.

Las unidades fenilpropano están interconectadas entre sí por una serie de enlaces de tipo éter (C-O-C) y carbono-carbono (C-C), en los que participan tanto los anillos aromáticos como las cadenas laterales, dando lugar a una serie de subestructuras tales como: guayacilglicerol- β -aril éter, fenilcumarano, diarilpropano, resinol, bifenilo y difenil-éter, así como otras menos abundantes (figura 2.6). El enlace intermonomérico más frecuente, β -O-4', está presente en la subestructura guayacilglicerol- β -aril éter y es

frecuentemente la clave de los procesos de despolimerización. Por el contrario, otros enlaces como β -5' (en fenilcumarano), β -1' (en diarilpropano), β - β' (en resinol), 5-5' (en bifenilo) y 4-O-5' (en difenil-éter), son muy resistentes.

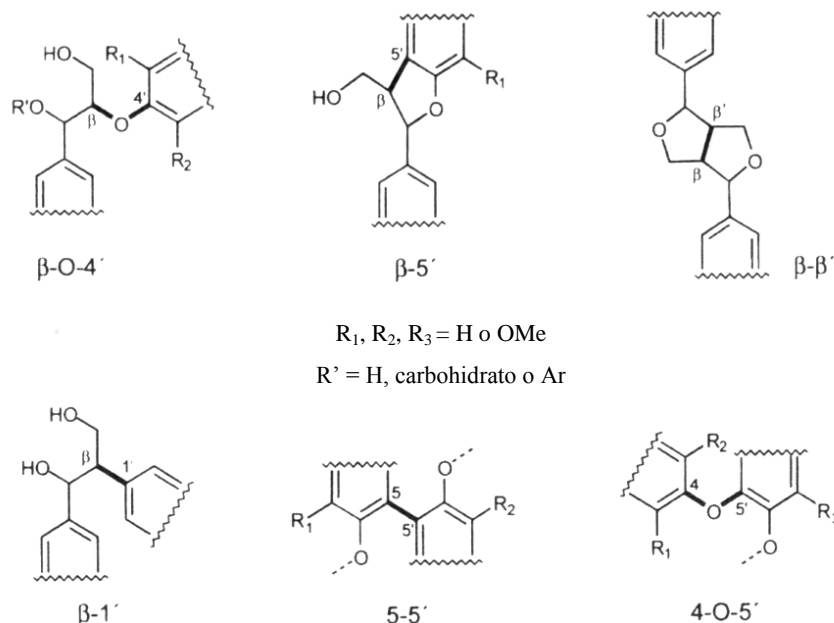


Figura 2.6. Enlaces más comunes en la lignina.

El tipo de unidades presentes en la lignina, así como los tipos de unión entre las mismas puede variar entre los distintos grupos de plantas (coníferas, frondosas y herbáceas). Incluso en una misma planta la composición de la lignina puede variar en los distintos tejidos y capas de la pared celular. La lignina de coníferas se forma mayoritariamente a partir del alcohol coniferílico (unidad G), mientras que la lignina de frondosas se sintetiza a partir de los alcoholes coniferílico y sinapílico (unidades G y S, respectivamente). La lignina de las plantas herbáceas está compuesta de unidades H procedentes del alcohol p-cumarílico, además de las unidades G y S en distintas proporciones. La existencia de dos, una o ninguna posición libre en las posiciones orto del grupo fenólico de las unidades H, G y S respectivamente es la causa de la distinta reactividad de cada tipo de lignina. Así por ejemplo, los dos grupos metoxilo de las unidades S evitan la condensación de lignina en los procesos de cocción.

Dado que la formación de los enlaces monoméricos que constituyen el polímero de lignina en la naturaleza es un proceso aleatorio, es difícil atribuirle una estructura definida. La complejidad de este polímero marca su gran resistencia al ataque de los microorganismos, a la vez que protege a los polisacáridos del ataque de los mismos

(Howard et al., 2003). Así mismo, su estructura proporciona rigidez y dureza a los tejidos vegetales, a la vez que minimiza la permeabilidad de dichos tejidos al agua (Evans y Betts, 1991). Sin embargo, es esta misma complejidad la que hace que el polímero sea difícilmente biodegradable.

La fuerte asociación encontrada entre la lignina y los carbohidratos de la madera sugiere la existencia de enlaces químicos y físicos entre ellos, dando lugar a los llamados complejos lignina – carbohidratos (LCC). Estos enlaces son más frecuentes entre lignina y hemicelulosa que entre lignina y celulosa, ya que las hemicelulosas son más reactivas y el área de contacto físico entre lignina y celulosa es menor que el existente entre lignina y hemicelulosas. Las uniones lignina-hemicelulosa se realizan mediante intermediarios cinamílicos como el ácido ferúlico, el ácido diferúlico y el ácido ρ -cumárico (Iiyama et al., 1990; Lam et al., 2001) los cuales se unen mediante diferentes intermediarios monoméricos a la cadena principal del xilano. Debido a estos enlaces, se forma una matriz compleja que juega un papel importante en las propiedades físicas y reactivas de la madera.

2.2 - Procesos implicados en la fabricación de pastas Kraft

En 2010, la producción total en la industria española de la pasta y el papel fue de 8 millones de toneladas, que se distribuyen en 1,8 millones de pasta de celulosa y 6,2 millones de papel y cartón. Así, España se sitúa en el sexto lugar de Europa, con 11 instalaciones de fabricación de pasta de celulosa y 83 de papel y cartón (ASPAPEL, 2011).

Existen muchos tipos de papel destinados a diferentes aplicaciones como libros, periódicos, usos higiénicos y sanitarios, cajas, envases y embalajes, sacos, etc. Dependiendo del producto final deseado, varían tanto la materia prima utilizada, como el proceso de producción. Por ejemplo, para producir papel prensa se utiliza normalmente fibra reciclada. En cambio, para la elaboración de papeles de impresión y escritura o papeles higiénicos y sanitarios, se utiliza fibra virgen, siendo el proceso de pasteado más utilizado el proceso Kraft. En los siguientes apartados se describen las materias primas más utilizadas y los procesos implicados en la producción de pasta Kraft.

2.2.1 - Materias primas utilizadas

♦ Materias primas madereras

En la actualidad, más del 90% de las fibras vírgenes usadas para la producción de papel provienen de la madera, aunque hasta mediados del siglo pasado, las fibras no madereras fueron la fuente exclusiva de fibras para la fabricación de papel.

Los fabricantes de pasta y papel suelen clasificar las plantas madereras en especies de fibra corta (frondosas) y de fibra larga (coníferas). Desde un punto de vista estructural, la diferencia principal entre coníferas y frondosas se sitúa en sus sistemas de conducción. En las coníferas, más primitivas y menos evolucionadas, son las fibras las responsables del soporte y la conducción. En las frondosas, de origen más reciente, estas funciones se realizan por separado y más eficientemente por células especializadas: las fibras son responsables del soporte y los vasos de la conducción. Las fibras de coníferas son largas (longitud 2-5 mm, anchura 30-60 μm), tienen una pared relativamente delgada y colapsan fácilmente. Las pastas elaboradas a partir de ellas son muy homogéneas, están constituidas casi exclusivamente por fibras y proporcionan papeles con elevadas resistencias mecánicas. Por el contrario, las maderas de especies frondosas tienen fibras más cortas (longitud 1 mm, anchura 10-20 μm), de pared gruesa y lumen estrecho. La proporción de fibras en las especies frondosas varía del 40 al 78%, con un contenido considerable en otras células especializadas de naturaleza no fibrosa. Estos elementos que aparecen en las pastas, no aportan mucha resistencia al papel y pueden presentar problemas en la posterior impresión. Sin embargo, las pastas de frondosas mejoran la formación de la hoja, lisura, volumen específico y opacidad, comparado con las pastas de coníferas.

Entre las distintas especies madereras, el *Eucalyptus globulus* es la más utilizada en la península Ibérica y en Iberoamérica. En España, existen unas 550.000 ha dedicadas al eucalipto, distribuidas entre Andalucía (44 %), Galicia (27 %), Extremadura (14 %) y la cornisa Cantábrica (11 %). Es una frondosa de crecimiento rápido (10-14 años), con una productividad media situada en 10 m^3/ha año y con una madera de alta calidad, que confiere unas propiedades especiales al producto final. Su lignina contiene más unidades siringilo que guayacilo, lo que facilita la cocción y el blanqueo (Ibarra et al., 2006). Además, su alto contenido en xilanos hace del eucalipto una materia prima muy adecuada en una biorrefinería con recuperación de

hemicelulosas. Por todas estas características, el *E. globulus* es la materia prima utilizada en la presente tesis doctoral.

♦ **Materias primas no madereras**

Las materias primas no madereras podrían suponer una alternativa, al menos parcial, al uso de madera para la producción de pasta de celulosa. Bajo esta denominación se incluyen una gran variedad de especies no arbóreas (lino, cáñamo, abacá, sisal y bambú, entre otros), así como los residuos generados en labores agrícolas (paja de cereal) e industriales (bagazo de caña de azúcar) (Alaejos et al., 2004). La producción de pasta de celulosa a partir de materias no madereras ha aumentado un 14,6% en el periodo 2000 – 2009, mientras que la producción de pasta de celulosa a partir de madera ha disminuido un 6,9% en el mismo periodo (FAO, 2011). Este hecho se debe principalmente a: 1) el valor añadido que se da a los cultivos agrícolas cuando se utilizan sus residuos para la producción de pasta; 2) la disponibilidad de estos materiales en países con limitados recursos forestales; 3) la posibilidad de obtener diferentes papeles especiales debido a la amplia variedad morfológica y en composición química que muestran las fibras no madereras; y 4) la reducción del consumo de reactivos químicos y energía en el pasteado y blanqueo debido a su estructura más porosa y accesible (Alaejos et al., 2004; Sánchez et al., 2011). Pese a estas ventajas, la producción de pasta a partir de materias no madereras sólo representaba un 8,4% de la producción total en 2009 (FAO, 2011), debido a los problemas asociados a su cultivo y uso. Entre las principales desventajas se encuentran: 1) los problemas de almacenaje y disponibilidad derivados de la estacionalidad de estas materias, es decir, de su cosecha en un periodo determinado del año; 2) su baja densidad, que complica y encarece su transporte hasta las fábricas; 3) su alto contenido en cenizas y extractos, que disminuye el rendimiento de producción de pasta; y 4) la necesidad, en muchos casos, de etapas de separación de las fibras previas al pasteado.

Dentro de las especies no madereras, algunas de las más utilizadas son sisal, lino, cáñamo, abacá, bambú, etc. Estudios recientes han demostrado el potencial de *Hesperaloe funifera* para la producción de papel (McLaughlin, 2000; Sanchez et al., 2010; Wong y McLaughlin, 2000). Las principales características de esta planta son sus largas y delgadas fibras (longitud 3,5-4,5 mm y anchura 7,0-10 µm) y su bajo contenido en lignina (10% lignina Klason). Estas características, junto con sus bajos

requerimientos hídricos (debido a su metabolismo ácido crasuláceo) hacen que sea una planta con gran potencial papelerero en áreas con escasos recursos acuíferos. Tras 5 años de cultivo, se puede recoger la primera cosecha, y posteriormente se recogen cosechas cada 3 años. Así, en plantaciones de alta densidad (27.000 plantas por hectárea) se pueden obtener aproximadamente 20 toneladas de biomasa seca por hectárea y año, tras la primera cosecha (Wong y McLaughlin, 2000). Por todas estas características, en la presente tesis doctoral se ha evaluado el uso de *H. funifera* en el esquema de biorrefinería forestal planteado, comparando las pastas obtenidas con aquellas obtenidas a partir de *E. globulus*.

2.2.2 - Pasteado

La transformación de la madera en papel puede realizarse por dos vías principales: tratamiento mecánico o tratamiento químico. En ambos procesos la materia prima que contiene la celulosa se separa en sus fibras individuales.

En los procesos de fabricación de pasta mecánica se aplican esfuerzos mecánicos de compresión y cizalla para separar las fibras y dejar la mayoría de la lignina en ellas, aunque hay disolución de algunos compuestos. En consecuencia, es un proceso con un alto rendimiento en cuanto a la producción de pasta, pero el consumo de energía es muy elevado y la capacidad de enlace fibra-fibra es baja.

En la fabricación de pasta química, se utilizan productos químicos para fraccionar y disolver la lignina y liberar las fibras. Dentro del pasteado químico, el proceso más utilizado a nivel industrial es el proceso Kraft, que representa aproximadamente el 80% de la producción mundial de pasta. Esto se debe a que, con este proceso, se obtienen pastas más resistentes y blanqueables hasta altos niveles de blancura, es posible aplicarlo a todas las especies de madera, utiliza ciclos cortos de cocción (comparado con los procesos a la sosa y al sulfito), y dispone de sistemas eficaces de recuperación de lejías negras (recuperando tanto productos químicos como energía). En cambio, presenta también una serie de desventajas como el alto costo de inversión, la polución por mal olor, el bajo rendimiento del pasteado y el alto costo del blanqueo (económico y medioambiental).

Existen también procesos semiquímicos, semimecánicos o químico-mecánicos de producción de pasta. Estos procesos constan de una etapa de cocción con un reactivo

químico bajo condiciones suaves, y una etapa mecánica de separación y fibrilación de las fibras celulósicas. Dependiendo de cuál de las dos etapas sea la predominante estos procesos estarán más próximos a los químicos o a los mecánicos.

Previo al pasteado, se deben llevar a cabo una serie de etapas comunes para los distintos tipos de pasteado. Así, los troncos de madera que llegan a la fábrica se descortezan y se astillan. Las astillas obtenidas se tamizan para seleccionar aquellas de 10-30 mm de longitud y 2-8 mm de espesor. Tanto las cortezas como las astillas de tamaño más pequeño se llevan a una caldera de biomasa, donde son quemadas para generar vapor y a partir de él, energía eléctrica. Las astillas seleccionadas se introducen en el esquema de producción de pasta Kraft que se detalla en la figura 2.7.

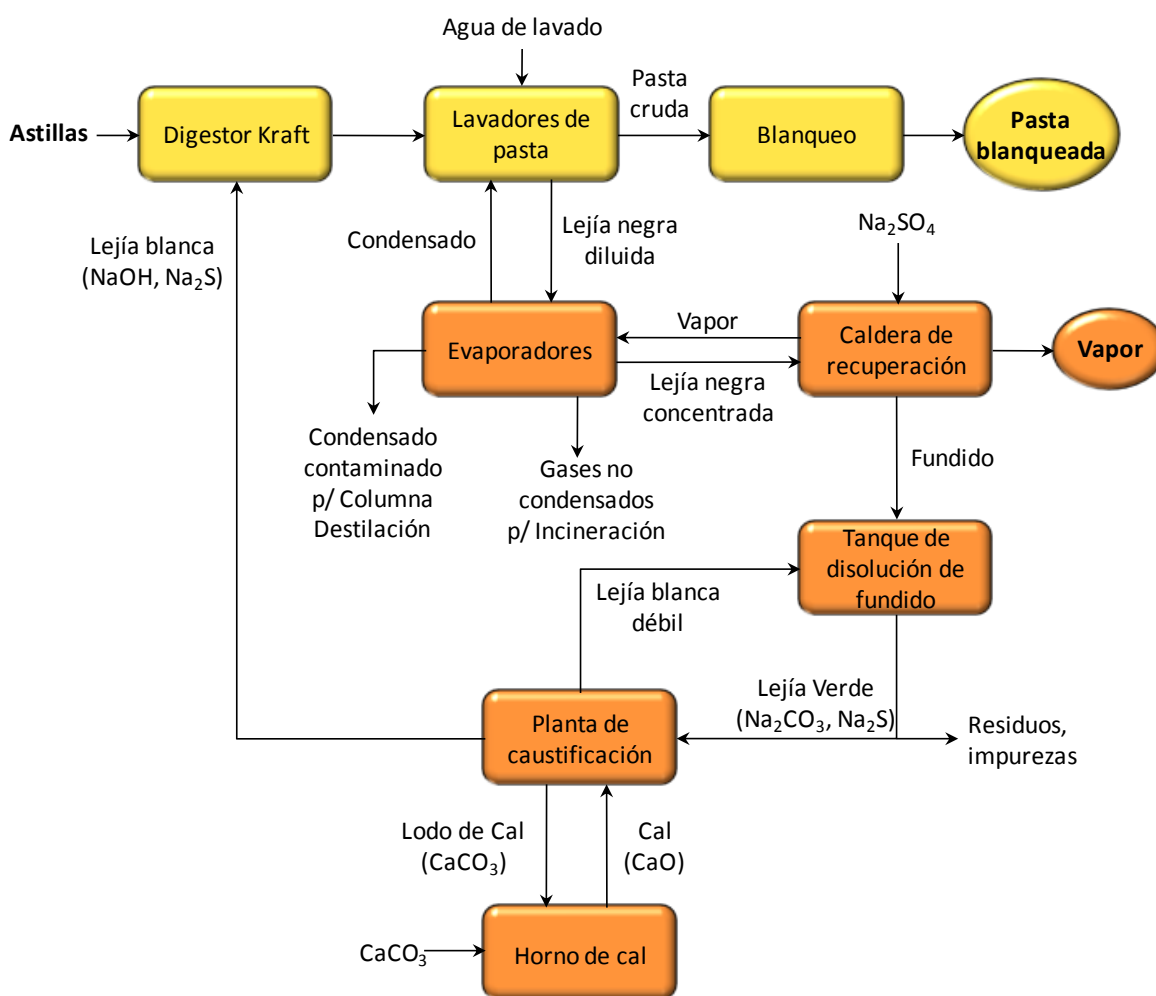


Figura 2.7. Esquema del proceso de pasteado Kraft, incluyendo el circuito de recuperación de lejía negra.

Las astillas pueden ser precalentadas con vapor previamente a su entrada al digestor, de manera que se elimina el aire, el cual interfiere en los procesos de impregnación. Tras entrar en el digestor, las astillas son impregnadas con la lejía blanca o licor de cocción (solución acuosa de hidróxido sódico y sulfuro sódico) a una temperatura de 155-175 °C. El tiempo de cocción, en condiciones de máxima temperatura, se encuentra alrededor de 1-2 horas. En estas condiciones, las fibras se liberan de la matriz de lignina y hemicelulosa mediante la disolución de la lignina y de buena parte de las hemicelulosas por la reacción con la lejía blanca. El grado de deslignificación obtenido depende de la carga de madera / reactivo químico (álcali activo, sulfidez e hidromódulo) y del tiempo y la temperatura de cocción, pero también de si se va a blanquear (número kappa bajo) o no el producto final. En procesos de cocción convencionales, la deslignificación de la madera de coníferas puede llegar a un número kappa de 30-35, permitiendo una resistencia de la pasta aceptable. En el caso de madera de frondosas el número kappa puede ser de 14-22.

La selectividad de la deslignificación cambia durante el proceso (Gellerstedt y Lindfors, 1984; Lindgren y Lindström, 1996) identificándose 3 fases: fase inicial (rápida), fase principal o masiva (media) y fase final o deslignificación residual (lenta). Aproximadamente el 20% de la lignina se disuelve durante el calentamiento de las astillas y de la lejía de cocción (fase inicial). La mayor parte de la lignina (60-70%) se disuelve durante la cocción a máxima temperatura (160-170 °C) (fase principal). Durante la fase final, la disolución de la lignina empieza a ser menos selectiva y es difícil eliminar la lignina residual prolongando el tiempo de cocción sin disminuir de manera importante el rendimiento del proceso y la resistencia de la fibra. Por ello, la cocción Kraft debe pararse cuando la deslignificación es aproximadamente del 90% (aunque puede depender de las condiciones de cocción). La lignina residual puede eliminarse por medio de procesos de deslignificación selectiva con oxígeno y durante las distintas etapas de blanqueo donde también se emplea oxígeno, ozono, peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro y otros. Sin embargo, incluso con los reactivos más selectivos, la deslignificación es lenta y difícil. La presencia de estructuras de lignina nativas estables frente a soluciones alcalinas, las reacciones de condensación de la lignina, y la presencia de enlaces lignina – carbohidratos estables frente a soluciones alcalinas, son las principales razones para esta difícil y lenta eliminación de la lignina residual.

Tras la cocción, la pasta se tamiza para separar los trozos de madera que hayan quedado sin digerir, se lava para separar la mezcla de cocción utilizada (lejía negra) y se envía bien al proceso de blanqueo o a la máquina de producción de papel. La madera sin digerir se devuelve al digestor o a la caldera de biomasa para quemarla y producir energía.

Una de las ventajas importantes del método Kraft es la recuperación de sus lejías negras, que no sólo permite la recuperación de los productos químicos, sino que, además, aprovecha el poder calorífico de las mismas para generar el vapor necesario para el proceso, incluso obteniendo un excedente de energía. La lejía negra recogida del digestor contiene sustancias orgánicas disueltas cuya composición química exacta depende de las características de la especie de la madera y de las condiciones de la cocción. Normalmente la lejía negra presenta un contenido en sólidos disueltos del 14-18%, que debe concentrarse considerablemente previamente a su combustión. Para ello la lejía negra se concentra mediante una evaporación multiefecto hasta un contenido en sólidos de 65-75%. A medida que el contenido en sólidos se incrementa se debe tener en cuenta que la viscosidad de la lejía negra también se incrementa, y puede ser demasiado alta para ser bombeada. A presión atmosférica el límite se encuentra alrededor de 72-74% de sólidos. La lejía negra puede ser concentrada hasta un contenido en sólidos del 80% en superconcentradores, que operan a mayor presión y temperatura.

Los condensados procedentes de la evaporación de las lejías negras presentan un grado de contaminación diferente en función de su origen, típicamente contienen compuestos de azufre total reducido, metanol y otros componentes volátiles. Antes de su utilización como agua en el proceso o su vertido, se efectúa una desorción o “stripping”. Los vapores de esta operación se incorporan en la caldera de cortezas, o de lejía, para su eliminación.

La lejía negra concentrada, con adición de sulfato de sodio (Na_2SO_4), es introducida en la caldera de recuperación para su posterior combustión, para recuperar el sodio y el azufre, así como obtener energía procedente de los gases de combustión. Un incremento en el contenido de sólidos en las lejías negras concentradas de 65-70% al 80-85% provoca un cambio en los balances de materia y energía, así como en las condiciones de combustión de la caldera de recuperación. Cuanta menos agua entra en

la caldera menor flujo de gases de combustión se obtiene, y cuanto mayor es el contenido en sólidos de la lejía negra, mayor temperatura de combustión se obtiene, lo cual hace que mayor cantidad de sodio sea vaporizado, que reacciona con el azufre y queda retenido en las cenizas. Se reducen así las emisiones de azufre procedentes de la caldera.

La materia fundida procedente de la caldera de recuperación se disuelve en agua o lejía blanca débil para producir lejía verde, compuesta principalmente de sulfuro de sodio (Na_2S) y carbonato sódico (Na_2CO_3). La lejía verde se clarifica y caustifica con hidróxido de calcio convirtiendo el carbonato de sodio en hidróxido de sodio para producir lejías blancas para la digestión.

Las cenizas y otras impurezas son eliminadas del proceso por decantación de la lejía verde. Los lodos de carbonato cálcico procedentes del proceso de caustificación se separan por filtración de las lejías blancas, se lavan y se calcinan en un horno de cal para regenerar la cal viva. El óxido de calcio se hace reaccionar con agua y se obtiene hidróxido de calcio, que se emplea en el proceso de caustificación. La calcinación de los lodos se efectúa en un horno rotatorio, con aporte de combustible (coque, carbón, fuel o gas).

2.2.3 - Blanqueo

Para producir pastas químicas de alta calidad con elevados grados de blancura es necesario utilizar métodos de blanqueo que continúen la deslignificación de la pasta iniciada en la cocción y reduzcan el color. El blanqueo total de una pasta química se realiza en sucesivas etapas, utilizando diferentes productos químicos (cloro, hidróxido sódico, hipoclorito sódico, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, oxígeno, ozono, hidrosulfitos de sodio o ditiosulfato sódico) y diferentes condiciones de consistencia, concentración del reactivo químico, pH, temperatura, tiempo de retención, etc. Las condiciones y/o reactivos varían en cada etapa pero siempre teniendo en cuenta el compromiso entre el aumento del grado de blancura y la pérdida de propiedades mecánicas debido a la degradación de las fibras de celulosa. Se ha observado que se puede conseguir una mayor blancura con una menor degradación de las fibras si se aplican varias etapas en serie con cantidades más pequeñas de reactivos y con un lavado entre etapas. En las primeras etapas se utilizan reactivos que contribuyen a la

deslignificación de las pastas, mientras en las últimas etapas se utilizan agentes que eliminen el color residual. El blanqueo se consigue eliminando los compuestos que son capaces de adsorber luz visible o modificándolos para reducir esta capacidad.

Los reactivos clorados (cloro, hipoclorito y dióxido de cloro) utilizados para el blanqueo de pasta cloran la lignina residual, solubilizándola y generando cloroligninas tóxicas. Estos productos clorados imposibilitan, por problemas de corrosión, la recuperación de los efluentes de blanqueo de forma análoga a lo que se hace con las lejías residuales de cocción. Por estas razones se justifica eliminar, o al menos reducir, el uso de agentes clorados en el blanqueo. En este sentido, los blanqueos ECF (elemental chlorine free) proponen evitar el uso del cloro molecular en las secuencias de blanqueo, mientras que los blanqueos TCF (totally chlorine free) prescinden de cualquier blanqueante clorado y recurren en su lugar a compuestos oxigenados (oxígeno, peróxido de hidrógeno y ozono). En cualquier caso, las secuencias anteriormente mencionadas no resultan tan selectivas pues se produce un ataque apreciable a las cadenas de celulosa, perdiéndose calidad en el producto final (Kishimoto y Nakatsubo, 1998; Quesada et al., 1998) y además algunos reactivos, como el peróxido de hidrógeno, son costosos. En esta situación, la biotecnología se ha presentado como una posible solución e investigadores de todo el mundo han buscado la forma de transferir al blanqueo los procesos de degradación selectiva de la lignina que realizan en la naturaleza hongos y bacterias, como se verá en el apartado 2.6.2.

Entre los agentes blanqueantes no clorados, el peróxido de hidrógeno es uno de los más utilizados. En condiciones relativamente moderadas, el peróxido actúa como un agente de blanqueo no deslignificante que mejora la blancura de las pastas con pérdidas insignificantes de rendimiento, aunque bajo condiciones más severas, puede comportarse como un agente deslignificante. Las principales ventajas de este reactivo son su facilidad de transporte, almacenamiento, manipulación y aplicación, su versatilidad y la naturaleza no tóxica e inocua tanto del reactivo como de sus productos de reacción. Entre sus desventajas se encuentra la necesidad de aplicarlo en condiciones alcalinas y su susceptibilidad a la descomposición.

El peróxido de hidrógeno, debido a las ventajas mencionadas, será el reactivo de blanqueo utilizado en la presente tesis. Además se utilizará una etapa de extracción alcalina previa al blanqueo con peróxido de hidrógeno. Esta etapa no es propiamente un

blanqueo, pero se considera una etapa dentro de diferentes secuencias de blanqueo y tiene como objetivo eliminar lignina modificada. Inmediatamente después de la extracción alcalina la pasta queda visiblemente más oscura, debido a la oxidación de fenoles a quinonas. Por ello, se evita utilizar esta etapa al final de la secuencia de blanqueo. Sin embargo, cuando se utiliza en etapas intermedias, esta etapa favorece la producción de pastas blanqueadas más resistentes e incrementa la blancura de las pastas al final de la secuencia de blanqueo. Además, aumenta la limpieza de las pastas, ya que no sólo disuelve la lignina oxidada sino que también elimina resinas y otras impurezas.

2.3 - Concepto de biorrefinería

En los últimos años, la necesidad de fuentes de energía renovables, el gran aumento y la fluctuación del precio del petróleo y los incentivos de las administraciones públicas para trabajar en bioenergías han contribuido al desarrollo del concepto de biorrefinería (Chirat et al., 2010). Se basa en desarrollar un modelo similar al de una refinería petrolífera, en el que se obtengan combustibles y diversos productos químicos, pero usando como materia prima una fuente renovable: la biomasa. Así, el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) del Departamento de Energía de EE.UU. define la biorrefinería como una estructura que integra procesos de conversión de biomasa y equipamiento para producir combustibles, energía y productos químicos de valor añadido a partir de biomasa. De manera análoga, el Centro de Investigación Energética de los Países Bajos (Energy Research Center of the Netherlands, ECN) define la biorrefinería como aquellas instalaciones en las que tiene lugar el fraccionamiento de la biomasa en diferentes componentes, que pueden dirigirse al mercado directamente o ser transformados previamente mediante diferentes tratamientos.

Mediante la producción de múltiples productos, una biorrefinería puede beneficiarse de los diferentes componentes de la biomasa y maximizar su valor como materia prima. Una biorrefinería puede, por ejemplo, producir uno o varios productos químicos de gran valor añadido en pequeñas cantidades junto grandes cantidades de combustibles de bajo valor, a la vez que genera electricidad y calor de proceso para su propio uso y/o exportación. De esta forma, la producción de productos de alto valor mejora la rentabilidad, la obtención de altos volúmenes de combustibles ayuda a

solventar las necesidades energéticas del país, y la generación de electricidad reduce los costes y reduce emisiones de gases de efecto invernadero.

Existen distintas clasificaciones de las biorrefinerías, en función de la materia prima utilizada y de las tecnologías empleadas. Kamm y Kamm (2007) definen 3 sistemas de biorrefinerías:

- 1) **Biorrefinería lignocelulósica**: utiliza materias primas celulósicas procedentes de la biomasa y en los residuos agroindustriales.
- 2) **Biorrefinería de cultivo integral**: emplea como materia prima cereales como el maíz.
- 3) **Biorrefinería “en verde”**: se basa en la utilización de cultivos vegetales inmaduros, como la hierba o los cereales.

Por otro lado, el Laboratorio Nacional de Energías Renovables (NREL) del Departamento de Energía de EEUU (Wright et al., 2006) establece otra clasificación de las biorrefinerías, dividiéndolas en 5 plataformas en función de la materia prima utilizada, las tecnologías empleadas y los productos obtenidos:

- 1) **Plataforma Bioquímica (Plataforma de procesamiento de azúcares)**: Utiliza como materia prima materiales lignocelulósicos y biomasa con almidón. Desarrolla tecnologías para romper la celulosa, el almidón y la hemicelulosa en azúcares que pueden ser procesados para producir bioetanol o productos químicos. La lignina puede quemarse para generar electricidad y calor de proceso o puede convertirse en combustibles y productos químicos. Los principales procesos incluyen: hidrólisis química o enzimática, fermentación, biotransformación y procesos químicos y catalíticos.
- 2) **Plataforma termoquímica (Plataforma de procesamiento de gas de síntesis)**: Utiliza como materia prima materiales lignocelulósicos, pero también plásticos, caucho, etc. Se basa en la conversión de biomasa sólida en combustibles gaseosos o líquidos mediante calentamiento en una atmósfera limitada de oxígeno (gasificación) o en ausencia de oxígeno (pirólisis). Este proceso puede aumentar de manera importante la eficacia global y además permite como alternativa convertir la biomasa en productos químicos o materiales de valor añadido. Así, los productos obtenidos con en esta plataforma serán: gas de

síntesis, aceite de pirólisis, productos químicos de alto valor y combustibles líquidos o gaseosos.

- 3) **Plataforma de procesamiento de biogás**: La materia prima utilizada son efluentes líquidos o estiércol. Mediante digestión anaerobia con microorganismos, descompone la biomasa produciendo metano y dióxido de carbono. El gas rico en metano generado se puede utilizar como combustible o para obtener productos químicos.
- 4) **Plataforma de cadenas ricas en carbono (Plataforma de procesamiento de aceite)**: Utiliza como materia prima aceites de plantas como soja, colza, maíz o palma. La transesterificación de estos aceites vegetales produce biodiesel. Además, los ácidos grasos y la glicerina derivada del biodiesel pueden utilizarse para obtener productos químicos.
- 5) **Plataforma de productos de plantas**: La reproducción selectiva y la ingeniería genética puede desarrollar plantas que produzcan gran cantidad de materia prima o productos químicos o incluso compuestos que la planta no produce naturalmente. De esta forma la biorrefinería tiene lugar en la misma planta y no en una fábrica.

El NREL señala como plataformas más prometedoras aquellas que utilizan biomasa lignocelulósica: la plataforma bioquímica y la plataforma termoquímica. En base a ellas, define el concepto de biorrefinería lignocelulósica que se muestra en la figura 2.8.

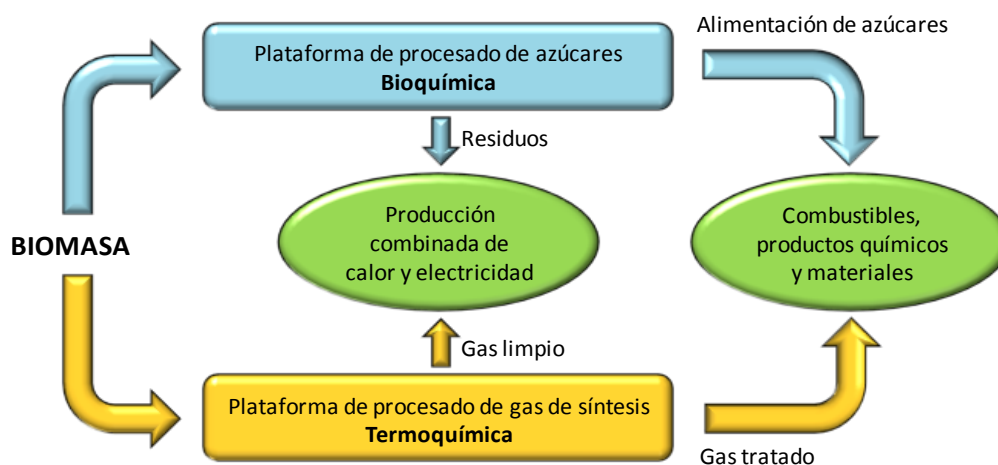


Figura 2.8. Concepto de biorrefinería basado en la plataforma de procesamiento de azúcares (bioquímica) y la plataforma de procesamiento de gas de síntesis (termoquímica) (NREL, 2011).

Las ventajas de la biorrefinería lignocelulósica incluyen el carácter asequible y abundante de las materias primas y la posibilidad de producción de una amplia variedad de productos, como se puede observar en la figura 2.9. Las dificultades que presenta son fundamentalmente tecnológicas y sobre el aprovechamiento de la lignina.

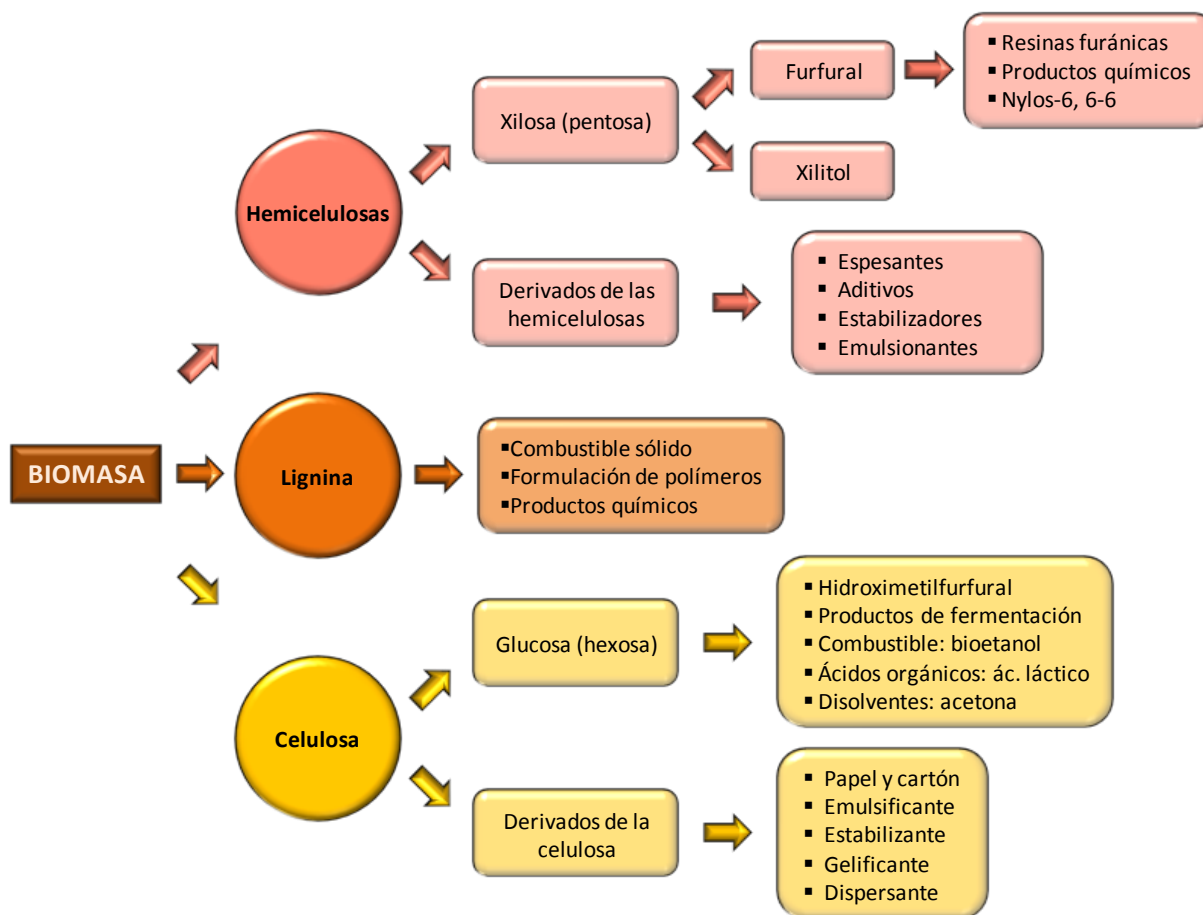


Figura 2.9. Productos que pueden obtenerse en una biorrefinería lignocelulósica.

El desarrollo de estas biorrefinerías a nivel industrial ya es una realidad en algunos países. Ejemplos de biorrefinerías industriales, piloto o demostraciones que utilizan plataformas bioquímica o termoquímica se muestran en las tablas 2.2. y 2.3 respectivamente.

Tabla 2.2. Ejemplos de biorrefinerías bioquímicas industriales, piloto o demostraciones.

Planta	País	Materia Prima
Lignol Innovations, IN	Colorado, EEUU	Residuos de madera
BIOCentrum DTU	Dinamarca	Residuos agrícolas, biomasa residual
Biogasol	Dinamarca	Paja de cereal, bagazo de caña y madera
IBUS pilot plant	Dinamarca	Paja de trigo, biomasa residual
Inbicon – DONG Energy	Dinamarca	Paja de cereal
Abengoa Bioenergía	España	Paja de cereal
VTT	Finlandia	Madera, residuos, lignocelulosa, etc.
SMBE- Soufflet Group	Francia	Trigo
Royal Nedalco	Holanda	Paja de cereal
Old Town Fuel and Fibers	Main, EEUU	Hemicelulosa extraída de la madera
Pacific Ethanol	Oregon, EEUU	Madera y residuos agrícolas
ZeaChem, Inc	Oregon, EEUU	Residuos forestales y agrícolas

Tabla 2.3. Ejemplos de biorrefinerías termoquímicas industriales, piloto o demostraciones.

Planta	País	Materia Prima
Bioliquid ITC-CPV	Alemania	Biomasa
IEC-TU Freiberg	Alemania	Biomasa
Gussing	Austria	Madera
VTT	Finlandia	Madera, residuos, lignocelulosa, etc.
Range Fuels	Georgia, EEUU	Biomasa forestal
Bio-MCN / Biorefinery cluster	Países Bajos	Biomasa lignocelulósica, glicerol
Chemrec AB	Suecia	Lejía negra
Växjö Värnamo Biomass Gasification Centre	Suecia	Biomasa lignocelulósica
Flambeau River Biofuels	Wisconsin, EEUU	Residuos forestales
New Page	Wisconsin, EEUU	Residuos forestales

2.4 - Adaptación de un proceso Kraft al concepto de biorrefinería lignocelulósica

Las instalaciones de la industria de la pasta y el papel constituyen una base ideal para la biorrefinería lignocelulósica ya que están situadas cerca de numerosas fuentes de biomasa, como madera y residuos forestales y agrícolas, y disponen de la infraestructura necesaria para distribuir el producto final (Marinova et al., 2009). Además, buena parte de sus instalaciones pueden ser usadas en la nueva biorrefinería, minimizando el incremento en el coste adicional de convertir una fábrica de pasta en una biorrefinería (Helmerius et al., 2010).

Actualmente, existen biorrefinerías que se centran en la producción de combustibles líquidos para el transporte, como el etanol, a partir de materiales lignocelulósicos (bioetanol de segunda generación). Sin embargo, teniendo en cuenta que el precio de la pasta química se encuentra en torno a 500-600\$ por tonelada, sería necesario que el etanol obtenido a partir de los polisacáridos de dicha pasta (con un rendimiento del 50%) fuese al menos 3-3,5\$/galón, para ser económicamente competitivo (Helmerius et al., 2010; Van Heiningen, 2006). Por ello, en lugar de centrarse en la fracción celulósica de la biomasa, que tiene un alto valor en aplicaciones papeleras, las investigaciones en este campo deben ser dirigidas hacia el aprovechamiento de las fracciones de hemicelulosa y lignina. Además, al utilizar estas fracciones para la generación de productos químicos y/o etanol, los beneficios de las actuales fábricas de pasta se verían incrementados de manera significativa (Ragauskas et al., 2006; Van Heiningen, 2006).

De acuerdo con esta idea, el Departamento de Energía de EE.UU. en su documento Agenda 2020, señala que la industria de los productos forestales (principalmente la industria de la pasta y el papel) puede utilizar la infraestructura existente para desarrollar una Biorrefinería Integrada de Productos Forestales (Integrated Forest Products Biorefinery, IFPB). Una IFPB utiliza tecnología avanzada para producir, a partir de materiales forestales, bio-energía y bioproductos además de productos tradicionales de esta industria (Agenda-2020, 2010). De manera similar, la Unión Europea en su documento Visión 2030 del séptimo Programa Marco señala como una de las áreas de investigación importantes la producción integrada de pasta, energía y productos químicos a partir de madera (Vision-2030, 2006). Los objetivos de estas

biorrefinerías son la sostenibilidad, obtener productos de valor antes del pasteado, valorizar el proceso global desde un punto de vista químico y aprovechar las corrientes residuales y su potencial tanto químico como térmico.

Como se ha visto en el apartado 2.2.2, en una fábrica Kraft convencional, la mayor parte de las hemicelulosas y de la lignina presentes inicialmente en la madera son extraídas por la lejía blanca y llevadas a la caldera de recuperación donde se queman para producir vapor y electricidad y recuperar los reactivos de cocción. Estos componentes suponen en su conjunto casi un 50% del peso de la madera y mientras la lignina, con elevada relación C/H, tiene un alto poder calorífico (27 MJ/kg), las hemicelulosas sólo aportan 13,6 MJ/kg. Por tanto, si se extraen las hemicelulosas antes del pasteado, podrían recuperarse sin ser degradadas y utilizarse para obtener etanol o compuestos de mayor valor añadido como ácido acético, furfural xilitol o polímeros, sin modificar de manera importante la generación de energía en la caldera de recuperación (Agenda-2020, 2010; Mendes et al., 2009; Van Heiningen, 2006).

La lignina disuelta en las lejías de cocción podría seguir usándose como combustible. Si bien, con la tecnología actual, el balance energético en la industria de pasta es positivo y cabe la posibilidad de disponer de un excedente de lignina que podría extraerse de la lejía negra o en una extracción previa al pasteado, para obtener productos químicos derivados (Helmerius et al., 2010; Van Heiningen, 2006). Alternativamente, la lejía negra podría gasificarse obteniendo gas de síntesis que podría convertirse en electricidad, combustibles como hidrógeno u otros combustibles para transporte, y/o productos químicos de alto valor añadido (Agenda-2020, 2010; Helmerius et al., 2010; Van Heiningen, 2006).

Los residuos de madera obtenidos en distintos puntos de la fábrica, como cortezas, astillas de pequeño tamaño, incocidos, etc., también podrían ser sometidos a gasificación para obtener gas de síntesis, y a partir de él electricidad, combustibles, etc.

A través de todas estas tecnologías, la fábrica Kraft se transformaría en una Biorrefinería Integrada de Productos Forestales (figura 2.10). Estas biorrefinerías pueden convertirse en las biorrefinerías lignocelulósicas más importantes, debido a la disponibilidad de residuos forestales, la sinergia con las infraestructuras existentes y los costes de capital y operación (Huang et al., 2010).

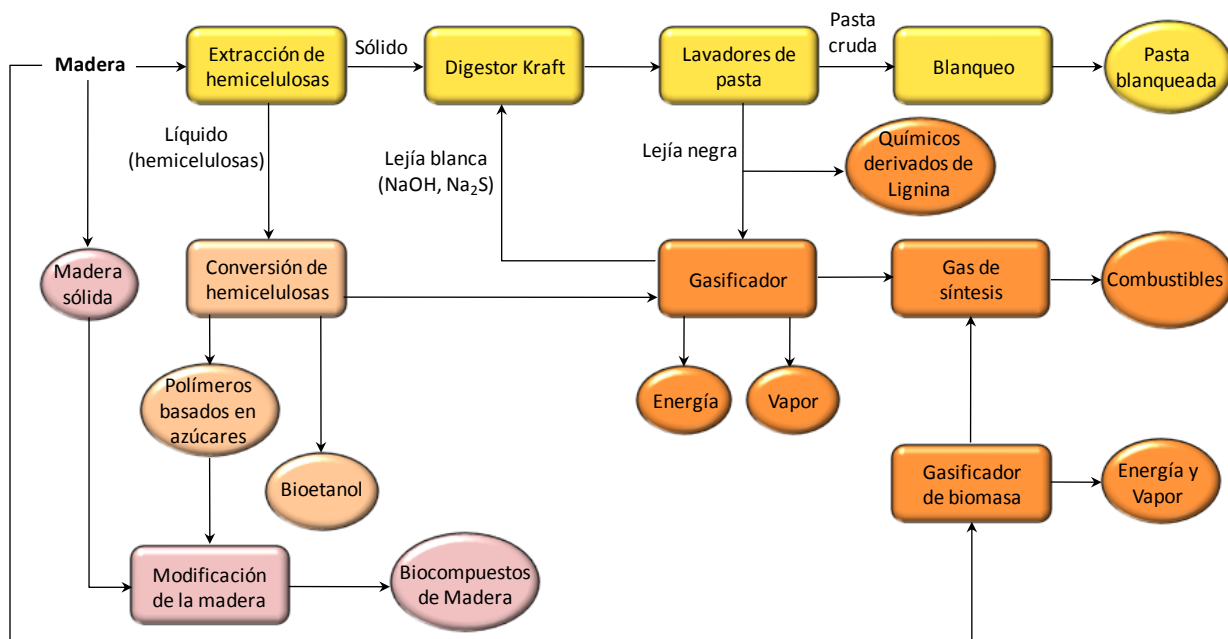


Figura 2.10. Esquema de una Biorrefinería Integrada de Productos Forestales (Van Heiningen, 2006).

2.4.1 - Extracción de hemicelulosas previa al pasteado Kraft

La extracción de hemicelulosas antes del pasteado puede llevarse a cabo con tratamientos alcalinos, tratamientos ácidos o tratamientos con vapor o agua a alta temperatura (Al-Dajani y Tschirner, 2008; Al-Dajani et al., 2009; Carvalheiro et al., 2008; Mao et al., 2010; Marinova et al., 2009; Vila et al., 2011; Wu et al., 1999). Los métodos de extracción deben integrarse de manera adecuada en el proceso Kraft, y además facilitar la utilización de la corriente extraída. Por ello deben utilizar soluciones acuosas con reactivos compatibles con el proceso y que puedan separarse fácilmente permitiendo la utilización de las hemicelulosas. Además, la degradación que generen en la fracción celulósica debe ser mínima para permitir obtener un papel con unas propiedades mecánicas adecuadas. Por otro lado, desde un punto de vista medioambiental, los tratamientos con vapor o agua presentan la ventaja de no utilizar reactivos químicos, evitando los costes de recuperación, neutralización y/o corrosión y disminuyendo el impacto ambiental.

Independientemente del método utilizado, la fracción líquida extraída puede contener oligosacáridos que deben ser convertidos en monómeros en una segunda etapa de hidrólisis, antes de que puedan utilizarse como fuente de carbono y energía en el

proceso de fermentación. Además, esta fracción líquida también puede contener lignina y productos de degradación que podrían inhibir los procesos biológicos consecutivos (hidrólisis enzimática y fermentación). Todos estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar y optimizar el método de extracción de hemicelulosas. Así, tratamientos menos efectivos en la hidrólisis de hemicelulosas pueden ser más adecuados para el proceso global. En este sentido, los tratamientos con vapor o agua a temperaturas altas (explosión por vapor y autohidrólisis) pueden ser más adecuados (Carvalho et al., 2008). Por otro lado, comparado con la autohidrólisis, la explosión por vapor proporciona un residuo sólido con una estructura más abierta, que facilitará la difusión de reactivos durante el pasteado (Ahvazi et al., 2007).

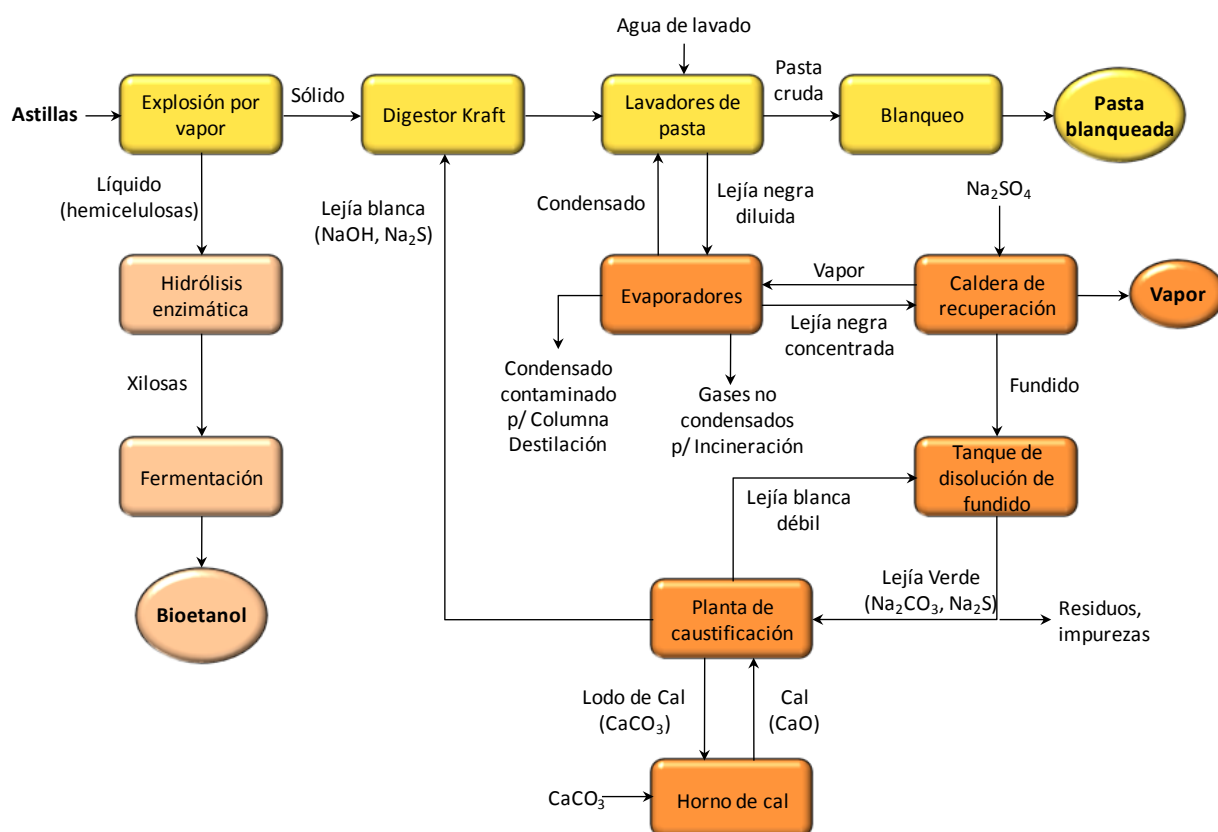


Figura 2.11. Integración del proceso Kraft en una biorrefinería lignocelulósica basada en la extracción de hemicelulosas mediante un proceso de explosión por vapor.

Basándonos en estas premisas, el método seleccionado para llevar a cabo la extracción de hemicelulosas en la presente tesis doctoral es el tratamiento de explosión por vapor. A través de este pre-tratamiento de las astillas, la fábrica Kraft se convertirá en una biorrefinería lignocelulósica en la que además de pasta de celulosa y energía se podrá obtener bioetanol y/o ácido acético, furfural, xilitol, etc. En la figura 2.11 se

muestra el esquema de la nueva biorrefinería basado en el esquema de una planta Kraft (Figura 2.7). El ciclo de recuperación de lejías negras, podría sustituirse por un proceso de gasificación, como se ha señalado anteriormente.

2.4.2 - Pre-tratamiento de explosión por vapor

Como se ha indicado en el apartado anterior, existen distintos pre-tratamientos de extracción de hemicelulosas, tales como autohidrólisis, explosión por vapor, hidrólisis ácida, extracción alcalina, etc. Entre ellos, destaca la explosión por vapor ya que permite la recuperación de todos los componentes de la madera sin provocar una degradación completa de ninguno de ellos en favor de otro (Britt, 1970). Además, comparado con otros pre-tratamientos, no utiliza reactivos químicos peligrosos y origina un menor impacto ambiental, menor consumo de energía y menor coste inmovilizado (Avellar y Glasser, 1998; Focher y Marzetti, 1991).

El pre-tratamiento de explosión por vapor es un proceso hidrotérmico que consiste en un tratamiento con vapor saturado a relativamente alta presión, seguido de una rápida descompresión. La intensidad o severidad del tratamiento depende tanto de la temperatura como del tiempo de tratamiento y se determina según la ecuación [1] definida por Overend y Chornet (1987), donde T es la temperatura en °C y t es la duración del tratamiento en minutos.

$$\ln \left(\frac{1}{1 - \frac{t}{t_0}} \right) = \frac{E_a}{R(T - T_0)} \quad [1]$$

Este tratamiento modifica el material lignocelulósico tanto químicamente, debido al tratamiento con vapor, como física o mecánicamente debido a la rápida descompresión.

La despresurización final provoca una evaporación del agua interna, creando fuerzas de cizalladura que producen separación de fibras, principalmente en las zonas de celulosa amorfa más débil. Además se produce una rotura de las paredes de las fibras, que aumenta la accesibilidad del material (Li et al., 2005). En la figura 2.12 se puede observar una imagen tomada con microscopio de barrido electrónico (SEM) de fibras de roble tras un tratamiento de explosión de vapor.

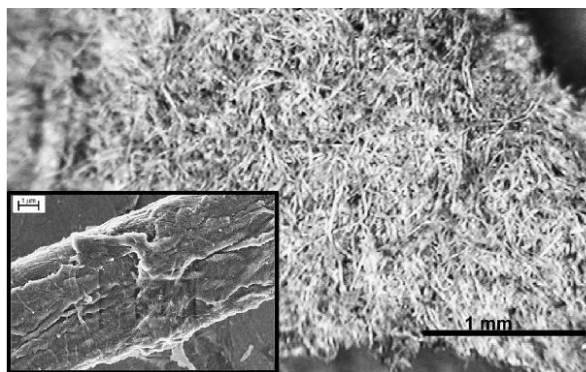


Figura 2.12. Imagen SEM de fibras de roble tras un tratamiento de explosión de vapor a 230°C durante 5 minutos. En el recuadro se muestra la imagen de la superficie de la fibra a escala 1 μm (Rennekar et al., 2005).

Cuando no se añaden otros reactivos, los cambios químicos originados son los mismos que los debidos a un tratamiento con vapor. Así, el vapor a alta temperatura, debido al alto grado de disociación del agua, provoca la hidrólisis de grupos acetilos de la hemicelulosa, liberándose ácido acético. Éste ácido disminuye ligeramente el pH del agua y, a la temperatura del proceso, cataliza la hidrólisis de la hemicelulosa. De esta forma se produce una autohidrólisis del material lignocelulósico, que origina una pérdida de hemicelulosa al solubilizarse en la fracción líquida. En la figura 2.13 se muestra la reacción de hidrólisis de la hemicelulosa y la posterior degradación de la xilosa a furfural que tiene lugar cuando las condiciones del tratamiento son severas (Josefsson et al., 2001; Li et al., 2005).

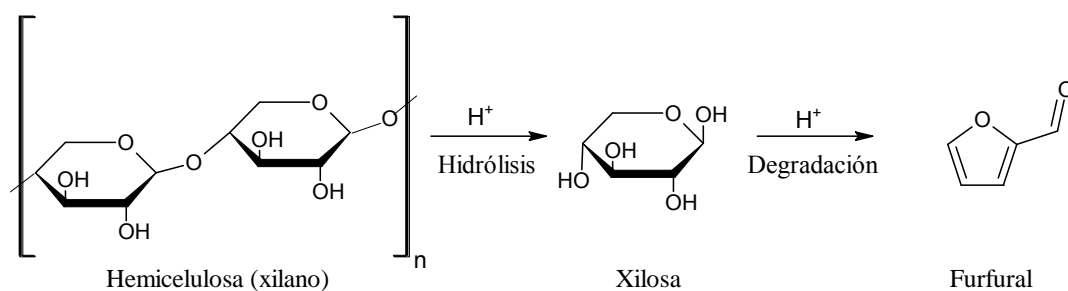


Figura 2.13. Reacciones de hidrólisis y degradación de la hemicelulosa durante el tratamiento de explosión por vapor. (Li et al., 2005)

La celulosa no se degrada durante la autohidrólisis, excepto a altas temperaturas y largos tiempos de tratamiento (temperaturas superiores a 210 °C) debido a su alto grado de cristalinidad y a la presencia de microfibras menos accesibles (Heitz et al., 1991; Josefsson et al., 2001; Li et al., 2005). Sin embargo, su grado de polimerización sí

disminuye durante la autohidrólisis, observando un decrecimiento continuo con la severidad del tratamiento, hasta valores del índice de polimerización 4 o 5 veces menor que el inicial (Heitz et al., 1991; Martinez et al., 1995). Las reacciones de hidrólisis de celulosa y posterior degradación de la glucosa que tendrían lugar durante tratamientos de alta severidad se muestran en la figura 2.14.

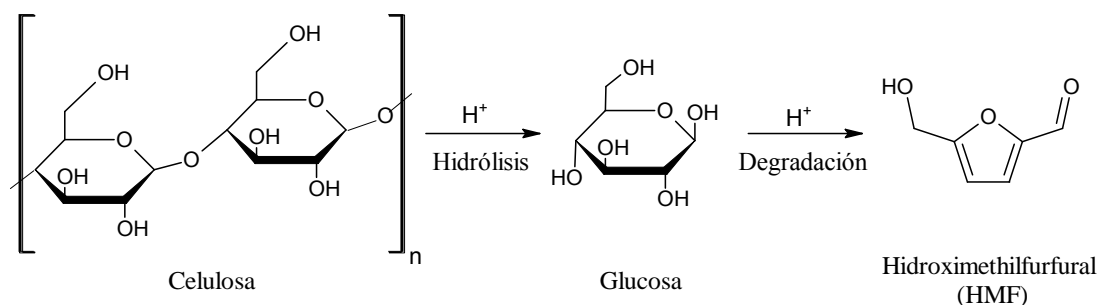


Figura 2.14. Reacciones de hidrólisis y degradación de la celulosa durante el tratamiento de explosión por vapor a altas temperaturas. (Li et al., 2005)

En la lignina se produce una disminución del contenido en estructuras β -O-4 y un aumento de su solubilidad en álcali y disolventes orgánicos (Jakobsons et al., 1995; Josefsson et al., 2001; 2002; Robert et al., 1988). Debido a la rotura de enlaces β -O-4, el peso molecular de la lignina debería disminuir como consecuencia del tratamiento de explosión por vapor. Sin embargo, se ha observado un aumento gradual del peso molecular al aumentar la severidad del tratamiento, debido a reacciones de repolimerización que dan lugar a estructuras más heterogéneas de lignina (Li et al., 2007). Un ejemplo de reacciones de despolimerización y repolimerización de la lignina, que tienen lugar durante la explosión por vapor, se muestra en la figura 2.15. En los tratamientos poco severos, o en los primeros momentos de los tratamientos más severos, se produce una solubilización de fragmentos de lignina de bajo peso molecular y alta reactividad debido a reacciones de despolimerización y de rotura de enlaces lignina-carbohidratos (LCC) (Burtcher et al., 1987). Si el tratamiento continúa (tratamientos de severidad S0 entorno a 3,2 – 4,5), la reacción dominante es la de repolimerización (Li et al., 2007). A mayor severidad, se produce también la reacción de eliminación de los grupos metoxilos, produciéndose catecoles (Heitz et al., 1995). Diferentes autores han sugerido también que los azúcares hemicelulósicos y/o sus productos de degradación (como el furfural) pueden reaccionar con la lignina (Aoyama et al., 1995; Dekker y Wallis, 1983; Heitz et al., 1991; Montane et al., 1994; Schultz et al., 1983).

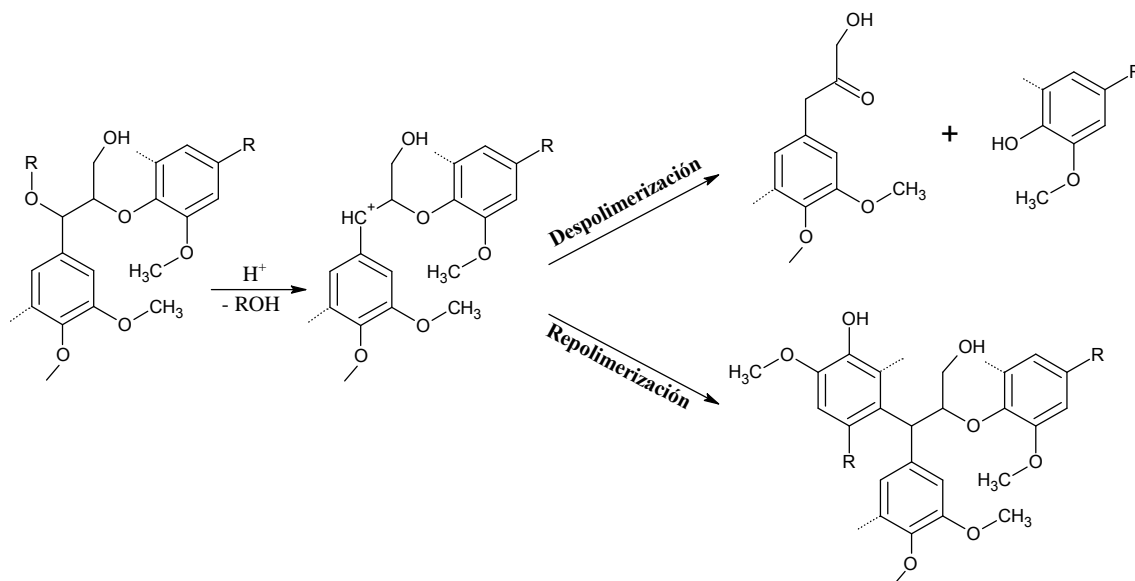


Figura 2.15. Reacciones de despolimerización y repolimerización de la lignina durante el tratamiento de explosión de vapor (Li et al., 2007).

Otros autores han observado también una redistribución de la lignina debido a su fluidización y aglomeración durante el tratamiento a temperaturas altas seguido de un rápido enfriamiento. Así, se han observado partículas esféricas de lignina que migran desde la pared celular a la superficie de la biomasa (Donaldson et al., 1988). Un efecto similar se ha observado en tratamientos con vapor a alta temperatura y en tratamientos con ácido diluido (Donohoe et al., 2008; Selig et al., 2007). La hipótesis que reportan estos autores sobre la formación de estas partículas de lignina es la siguiente: durante los tratamientos a temperatura superiores a la temperatura de transición de la lignina (120-200°C), este polímero pasa a un estado más fluido y la lignina de la pared celular puede ser forzada a coalescer en un ambiente acuoso. Este efecto, combinado con fuerzas de capilaridad e hidrofóbicas, permitiría la migración de la lignina desde la pared celular nativa a la fase líquida. Debido al enfriamiento tras del pre-tratamiento, la partículas de lignina se endurecen y quedan atrapadas entre las capas de la pared celular o se redepositan en la superficie de la biomasa (Selig et al., 2007).

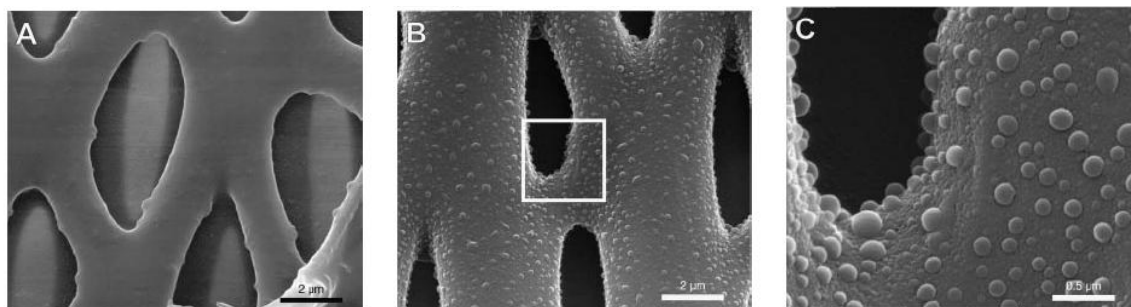


Figura 2.16. Imágenes SEM de la superficie de la pared celular de bagazo de maíz antes (A) y después (B y C) de un tratamiento ácido con 0,8% H_2SO_4 a 150°C durante 20 minutos. La imagen C es una ampliación de la región recuadrada en la imagen B (Donohoe et al., 2008).

♦ Aplicaciones del proceso de explosión por vapor

La primera aplicación en la industria papelera del proceso de explosión por vapor la desarrolló Mason en 1926, quien propuso utilizar un tratamiento con vapor seguido de una descompresión para fabricar cartón de alta densidad (Masonite board) (Mason, 1926). Posteriormente, Babcock (1932) propuso utilizar este proceso como pre-tratamiento en la producción de etanol.

Basándose en la idea de Mason, varios autores han estudiado el proceso de explosión por vapor como alternativa a los procesos de pasteado químico-mecánico (CMP) o químico-termo-mecánico (CTMP) tradicionales (DeLong, 1981; Mamers y Rowney, 1979; Mamers et al., 1981). Sin embargo, este método de pasteado no ha sido implementado industrialmente ya que la pasta obtenida no mostró propiedades superiores a la pasta CMP o CTMP (Heitner et al., 1993).

Siguiendo la idea de Babcock, el proceso de explosión por vapor se ha utilizado como pre-tratamiento en la producción de etanol a partir de diferentes materias primas como chopo (Oliva et al., 2003), eucalipto (Ramos et al., 1992), bagazo de maíz (Ohgren et al., 2006), bagazo de caña de azúcar (Glasser y Wright, 1998) y paja de trigo (Tomás-Pejó, 2010). Se ha demostrado que este pre-tratamiento aumenta la accesibilidad de la celulosa potenciando la posterior hidrólisis enzimática de la celulosa a glucosa. Sin embargo, se debe tener en cuenta también que al aumentar la severidad del tratamiento se potencia la degradación de los azúcares hemicelulósicos y la generación de compuestos tóxicos potencialmente inhibidores de las etapas posteriores de hidrólisis y fermentación (Jurado et al., 2009; Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a; b).

Por otro lado, este pre-tratamiento se muestra menos eficaz con las maderas de coníferas debido a su mayor contenido en lignina y menor número de grupos acetilo, lo que provoca que el proceso de autohidrólisis no sea tan efectivo. Con este tipo de maderas es necesario añadir un catalizador ácido, lo que implica mayor generación de productos tóxicos.

Por otro lado, el proceso de explosión por vapor puede utilizarse para extraer hemicelulosas y utilizar esta corriente como fuente de hexosas y pentosas que pueden convertirse en combustibles como etanol, u otros productos de valor añadido (Li et al., 2010) , como se ha indicado previamente. Además, el residuo sólido obtenido tras el tratamiento, podría ser pasteado más fácilmente, debido a que su estructura más abierta (comparado con la madera original) permitirá una mejor difusión de los reactivos de cocción en las fibras (Ahvazi et al., 2007). Por tanto este proceso podría utilizarse como pre-tratamiento al pasteado químico para aumentar los beneficios económicos de una fábrica Kraft convencional, transformando esta fábrica en una biorrefinería integrada de productos forestales (Ragauskas et al., 2006; Van Heiningen, 2006).

2.5 - Biotecnología aplicada a la producción de pasta Kraft y bioetanol

En las últimas décadas, la biotecnología está siendo una de las áreas más estudiadas en la industria de la pasta y el papel. A través del uso de microorganismos y enzimas, se busca el desarrollo de tecnologías limpias que mejoren y optimicen los tradicionales procesos de pasteado y blanqueo y que reduzcan tanto los consumo de energía y de reactivos químicos como las corrientes contaminantes generadas. Además, la búsqueda de nuevos combustibles menos contaminantes obtenidos a partir de fuentes renovables, ha potenciado el uso de la biotecnología en la producción de etanol a partir de material lignocelulósico (bioetanol), cambiando el concepto tradicional de la industria de la pasta y el papel hacia un concepto más amplio de biorrefinerías forestales, como se ha señalado anteriormente.

Dentro del esquema de producción planteado en esta tesis doctoral: una biorrefinería con extracción de hemicelulosas previa al pasteado Kraft, existen tres puntos principales en los que se podría aplicar la biotecnología: el pasteado (biopulpeo),

el blanqueo (bioblanqueo) y la producción de etanol lignocelulósico (bioetanol), como muestra la figura 2.17.

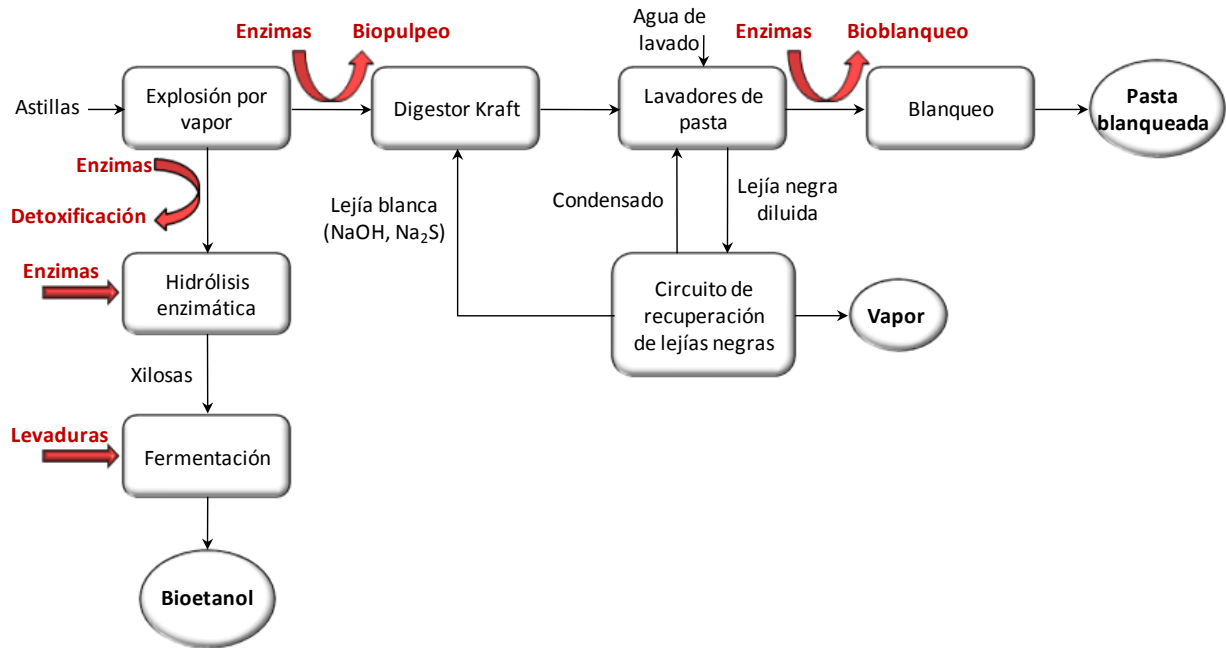


Figura 2.17. Aplicación de biotecnología en una biorrefinería lignocelulósica basada en la extracción de hemicelulosas mediante un proceso de explosión por vapor.

Las enzimas son catalizadores proteicos producidos a partir de organismos vivos, que aceleran la velocidad de las reacciones químicas y son altamente específicos del tipo de reacción que catalizan. Existen diferentes hongos y bacterias capaces de generar una batería de enzimas hidrolíticas y oxidativas que degradan el material lignocelulósico, siendo necesaria una mezcla de enzimas para degradar completamente el material. Las aplicaciones biotecnológicas en la industria de los productos forestales, se basan en la utilización de estas enzimas en distintas partes del proceso para degradar o eliminar un compuesto en concreto. Por ello, la aplicación directa de las enzimas, en lugar de la del microorganismo completo, mejora el proceso debido a su alta especificidad, evitando la degradación de otros compuestos. En función del polímero lignocelulósico que ataquen, las enzimas se pueden dividir en celulasas, hemicelulasas y ligninasas o enzimas ligninolíticas.

♦ Celulasas

Las celulasas son enzimas que hidrolizan el enlace 1,4- β -D-glucosídico de las cadenas de celulosa. Se dividen en tres grupos principales: endoglucanasas (EG), exoglucanasas o celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas (BG).

Las EGs actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces β -(1 \rightarrow 4) centrales de la cadena de celulosa creando extremos libres. Las CBHs actúan sobre los extremos reductores (CBH-I) o no reductores (CBH-II) de las cadenas liberando monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Las BGs, son las encargadas de hidrolizar las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa. Cuando estos grupos de enzimas trabajan conjuntamente se produce un efecto sinérgico que da lugar a una degradación eficiente de las cadenas de celulosa (Figura 2.18). La actividad enzimática de este tipo de enzimas depende no sólo de las condiciones de operación, como pH y temperatura, sino también de propiedades del sustrato (celulosa) como morfología, composición, grado de polimerización, cristalinidad y área superficial accesible (Eriksson et al., 2005; Josefsson et al., 2007).

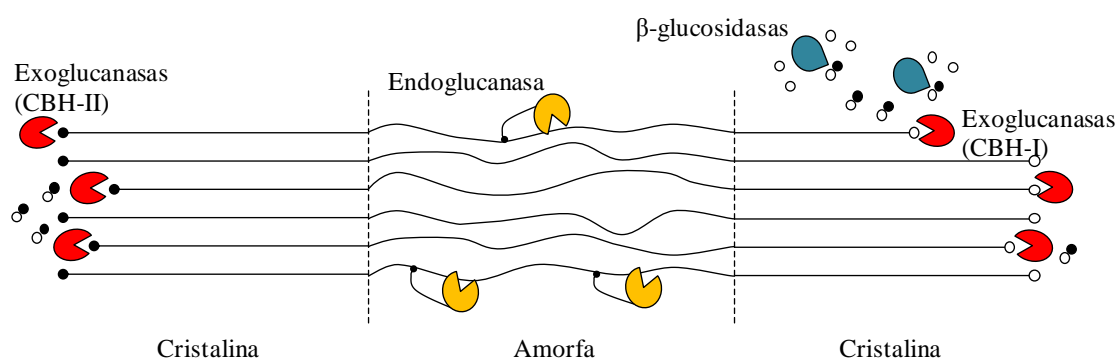


Figura 2.18. Representación esquemática de la degradación enzimática de la celulosa.

♦ Hemicelulasas: Xilanasas

Debido a la variedad de enlaces entre los diferentes azúcares de las hemicelulosas, existe un gran número de grupos de hemicelulasas con actividad específica para cada tipo de enlace. Así por ejemplo, las xilanasas o endoxilanasas atacan la cadena principal de las hemicelulosas y las β -xilosidasas hidrolizan xilooligosacáridos a xilosa. Otras enzimas rompen las ramificaciones, como las α -D-glucuronosidasas y las α -L-arabinosidasas que hidrolizan los enlaces entre los xilanos y los ácidos acéticos y fenólicos (Teeri y Henriksson, 2007). La hidrólisis de la

hemicelulosa es complicada, no sólo por su compleja estructura, sino también debido a las propiedades de las enzimas hemicelulósicas que requieren una acción coordinada de diversas enzimas para su correcta actuación.

Además de hidrolizar la hemicelulosa, las hemicelulasas favorecen la hidrólisis de la celulosa aumentando la accesibilidad del sistema celulolítico a las fibras de celulosa (Alvira et al., 2011). Su acción también potencia una posterior deslignificación debido a la rotura de enlaces lignina-carbohidratos, a la eliminación de xilanos reprecipitados que dificultan el acceso de los reactivos de blanqueo y/o a la eliminación de regiones de hemicelulosa con alto contenido en ácidos hexenurónicos (Henriksson y Teeri, 2007), como veremos en la sección 2.6.3.

♦ Ligninasas

Las enzimas que juegan un papel clave en la degradación de la lignina son lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. Las lacasas usan oxígeno molecular como sustrato y lo reducen hasta agua. Por el contrario, la LiP y MnP emplean peróxido de hidrógeno como aceptor final de electrones, por tanto es esencial la presencia en el medio de peróxido de hidrógeno, que a su vez es generado por la actividad de enzimas glioxal oxidasa, glucosa oxidasa y aril alcohol oxidasa.

Las lacasas son enzimas de tipo fenoloxidasas, que contienen cuatro átomos de cobre en su estructura, uno de los cuales está implicado en la oxidación de los sustratos, mientras el resto participan en el transporte de electrones hasta el oxígeno. En la figura 2.19 se muestra el mecanismo catalítico propuesto por Malmström (1982) para la lacasa.

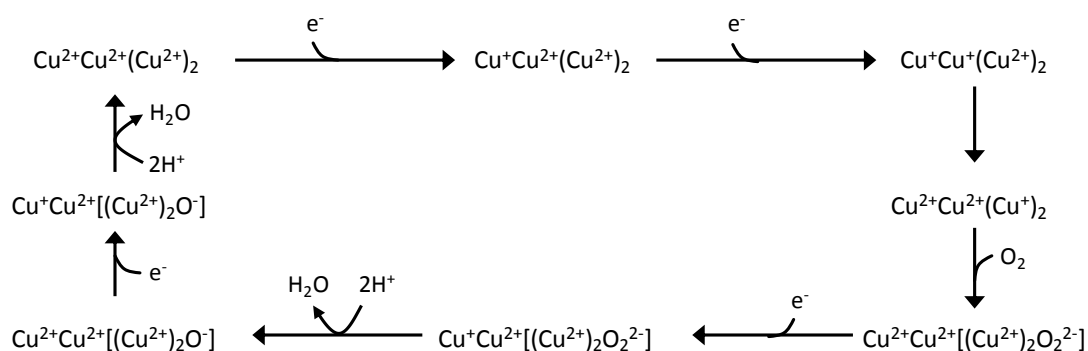


Figura 2.19. Mecanismo catalítico de las lacasas (Malmstrom, 1982).

El bajo potencial redox de las lacasas (entre 400 y 800 mV) sólo las permite oxidar compuestos fenólicos. Sin embargo, en presencia de mediadores redox son capaces de oxidar unidades no fenólicas. Además, los mediadores son compuestos de bajo peso molecular, que son capaces de difundir mejor en la fibra y reaccionar con las fracciones de lignina a las que la enzima no tiene acceso debido a su alto peso molecular. Esta cooperación de la enzima y los mediadores es lo que se denomina sistema lacasa mediador, en el cual la enzima oxida un mediador químico que, a su vez, oxida la lignina, como se indica en la figura 2.20.

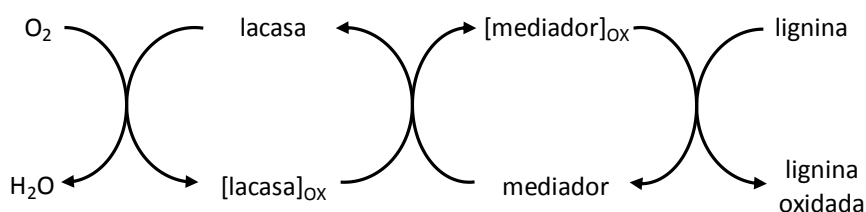


Figura 2.20. Mecanismo de actuación del sistema lacasa mediador sobre la lignina.

El 2-hidroxibenzotriazol (HBT) y el ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolin sulfónico (ABTS) son ejemplos de mediadores sintéticos. Sin embargo, debido al elevado coste y la toxicidad de estos mediadores, la búsqueda de nuevos mediadores naturales más eficaces que los ya existentes es uno de los objetivos más importantes en este campo de investigación. Así, se han encontrado algunos metabolitos fúngicos que actúan como mediadores, como el ácido 4-hidroxibenzoico y el alcohol 4-hidroxibencílico (Cañas y Camarero, 2010). En los crudos enzimáticos secretados por hongos ligninolíticos durante la biodegradación de biomasa, se han encontrado diferentes compuestos que actúan como mediadores, demostrando la existencia del sistema lacasa – mediador en la naturaleza. Algunos de estos compuestos son siringaldehído, acetosiringona, vanilina, acetovanilona, vanilato de metilo o el ácido p-cumárico. Estos compuestos fenólicos están presentes en las plantas herbáceas, o se originan durante la degradación de lignina (Cañas y Camarero, 2010).

2.5.1 - Biopulpeo

El biopulpeo consiste en la aplicación de un pre-tratamiento biológico a las astillas que modifique su estructura y composición con el fin de facilitar la separación de las fibras o la deslignificación en una etapa posterior de pasteado mecánico o

químico, respectivamente. Se basa en la habilidad de los hongos de pudrición blanca para degradar selectivamente la lignina en las etapas iniciales de la pudrición de la madera, dejando un residuo de celulosa relativamente intacto (Bajpai et al., 2001; Ferraz et al., 2008; Mendonça et al., 2008). Los hongos de pudrición blanca no sólo son capaces de producir enzimas que degraden la lignina, sino que también penetran en la madera para transportar estas enzimas dentro de las astillas (Messner y Srebotnik, 1994).

Los beneficios del biopulpeo incluyen: ahorro energético durante el desfibrado o refino, aumento de la deslignificación, disminución del consumo de álcali y del tiempo de pasteado necesario, mejora de las propiedades de resistencia de las pastas obtenidas y reducción del consumo de reactivos de blanqueo (Bajpai et al., 2001; Islam et al., 2008; Mendonça et al., 2008; Messner y Srebotnik, 1994; Oriaran et al., 1990; Wolfaardt et al., 2004). Sin embargo, el uso de hongos en estos pre-tratamientos tiene asociado una serie de desventajas como son la pérdida de rendimiento debido a la degradación de polisacáridos durante la deslignificación fúngica y la dificultad de asegurar condiciones asépticas y óptimas durante los largos tiempos de tratamiento requeridos debido al lento crecimiento de los hongos.

Para solucionar estos problemas, la aplicación directa de las enzimas a las astillas se ha convertido en una alternativa más atractiva industrialmente, ya que los tratamientos enzimáticos se llevan a cabo en unas pocas horas, son más selectivos y encajan más fácilmente en los procesos de pasteado existentes. Por ello, se han llevado a cabo diferentes trabajos para estudiar la viabilidad de los pre-tratamientos enzimáticos y su efecto en el pasteado y en el producto final obtenido. Se ha demostrado que pueden mejorar tanto el pasteado mecánico como el químico, reduciendo el consumo de energía (Maijala et al., 2008; Ramos et al., 2004) y aumentando la deslignificación (Dyer y Ragauskas, 2004; Jacobs-Young et al., 1998; Zhao et al., 2002), respectivamente.

Una desventaja del uso de enzimas en el biopulpeo es su baja efectividad cuando se aplican directamente sobre las astillas, debido a la dificultad de las enzimas para penetrar en la madera. Esto se debe a que la mayoría de los capilares de la madera son demasiado pequeños para permitir la entrada de moléculas enzimáticas y además a que el área superficial de las astillas no es suficiente para permitir un tratamiento enzimático efectivo (Grethlein, 1985). Por ello, las enzimas se han aplicado normalmente a materias primas que han sido previamente desfibradas (Burton, 2001) o a pastas

químicas en procesos de bioblanqueo (Eugenio et al., 2010a). En los casos en los que se quieren aplicar las enzimas directamente a la madera, es recomendable someter las astillas a vacío para facilitar la adsorción de las enzimas (Jacobs-Young et al., 1998) o a compresión para provocar fracturas en la madera que faciliten la penetración (Maijala et al., 2008; Pere et al., 2005). Existen otros tratamientos que provocan efectos similares, y por tanto podrían utilizarse como pre-tratamiento en el biopulpeo, aunque hasta el momento han sido menos estudiados para este fin. Entre ellos se encuentra el tratamiento de explosión por vapor. Como se ha indicado en el apartado 2.5, la rápida descompresión final provoca una separación de las fibras en paquetes y una rotura de las paredes de las fibras, que facilita la difusión de los reactivos o enzimas aplicados en etapas posteriores. Así, este pre-tratamiento ha demostrado mejorar tanto procesos de pasteado (Ahvazi et al., 2007; San Martin et al., 1995) como de hidrólisis enzimática para la obtención de azúcares fermentables (Jurado et al., 2009; Ruiz et al., 2008; Wu et al., 1999). Sin embargo, existen pocos trabajos sobre su efecto en un biopulpeo enzimático.

Entre las enzimas aplicadas en el biopulpeo se encuentran las celulasas, hemicelulasas (xilanasas), pectinasas y enzimas ligninolíticas como lignina peroxidasas y manganeso peroxidasas. Sin embargo, la aplicación del sistema lacasa mediador (SLM), ampliamente utilizado en el bioblanqueo, apenas se ha estudiado en el biopulpeo sin combinar su efecto con el de otras enzimas (Dyer y Ragauskas, 2004; Maijala et al., 2008; Petit-Conil et al., 2002). Por ello en esta tesis doctoral, se ha estudiado la aplicación de un tratamiento LMS después de un pre-tratamiento de explosión por vapor, y antes del pasteado Kraft, como alternativa al biopulpeo convencional.

2.5.2 - Bioblanqueo

Varias razones han motivado la aplicación de enzimas en el proceso de blanqueo. Por un lado, existen razones medioambientales, como la reducción de la carga contaminante derivada de la disminución en el consumo de reactivos clorados (en secuencias ECF). Por otro lado, las razones técnicas incluyen el aumento de selectividad hacia la lignina (en las secuencias TCF), la economía de reactivos de blanqueo y la mejora de la calidad de las pastas al obtenerse mayores blancuras. Sin embargo, la eficacia de los tratamientos enzimáticos es, hoy día, limitada y el objetivo actual no es

sustituir completamente el blanqueo químico, sino reducir su uso para limitar la contaminación hasta niveles asumibles y reducir el coste de reactivos químicos para hacer rentable la inversión. Al mismo tiempo, se pretende que la blancura y las resistencias mecánicas de las pastas no se resientan.

La aplicación directa de microorganismos tales como los hongos ligninolíticos que se emplean en el biopulpeo, tendría consecuencias indeseables en el bioblanqueo, como la degradación de la celulosa o la contaminación de las pastas con sustancias que acompañan o son producidas por los hongos. Por ello, la búsqueda, selección y posible modificación de enzimas implicadas en la degradación de lignocelulosa para adecuarlas a las condiciones industriales del blanqueo de pastas representa uno de los campos de investigación con mayor potencial en esta industria. El coste de las enzimas se ha ido reduciendo a medida que el bioblanqueo abría nuevas expectativas y no parece suponer un impedimento para el futuro.

Pese a que las xilanasas no degradan la lignina, éstas fueron las primeras enzimas utilizadas en el blanqueo de pasta Kraft (Viikari et al., 1986) y son hoy día las únicas que se aplican a nivel industrial. La aplicación de las xilanasas, previamente al blanqueo, ha demostrado que es posible alcanzar el nivel deseado de blancura con un ahorro de reactivos de blanqueo, reduciendo así la contaminación por cloroligninas. En años posteriores, otros trabajos confirmaron la capacidad de las xilanasas para mejorar los efectos de las etapas de blanqueo (Paice et al., 1988; Ragauskas et al., 1994; Senior y Hamilton, 1992; Viikari et al., 1994). Para explicar cómo actúan las xilanasas en el blanqueo de pasta Kraft se han descritos algunos mecanismos de actuación. Uno de ellos supone que las xilanasas eliminan los xilanos precipitados, depositados sobre las fibras y que dificultan el acceso de los reactivos de blanqueo. Una vez eliminada esta barrera, la acción de los reactivos sería mucho más eficaz (Kantelinen et al., 1993; Shah et al., 2000). Otra explicación supone que las hemicelulosas están unidas a la lignina por enlaces covalentes y que la acción de la enzima libera estos compuestos permitiendo su extracción del medio (Suurnäkki et al., 1996; Wong, 1997a). Por otro lado, existen evidencias de que parte de los grupos cromóforos proceden de la degradación de hemicelulosas durante el pasteado Kraft, como los ácidos hexenurónicos. Estas sustancias que quedan unidas a las hemicelulosas, aumentan el número kappa, consumen reactivos de blanqueo, retienen iones metálicos, favorecen el amarilleamiento de la pasta y contribuyen a la formación de ácido oxálico (Roncero et al., 2003; Wong,

1997a). Gracias a la acción de las xilanasas, estos compuestos son liberados una vez que se rompe su unión con las hemicelulosas (Valls et al., 2010; Wong, 1997b).

Posteriormente, se comenzó a prestar atención al empleo de enzimas ligninolíticas, como las peroxidasas y lacasas, en el bioblanqueo. Se han conseguido resultados interesantes utilizando peroxidasas que oxidan Mn^{2+} , sin embargo los resultados más prometedores tras comparar diferentes enzimas se han encontrado utilizando lacasas en presencia de mediadores (Sigoillot et al., 2005). Este sistema lacasa mediador, es capaz de oxidar tanto compuesto fenólicos como no fenólicos, como se ha indicado en el apartado 2.6.1. Este hecho, justo con la utilización de O_2 como aceptor final de electrones (frente al H_2O_2 utilizado por las peroxidasas) hace a estas enzimas altamente interesantes para el blanqueo de pasta celulósicas.

Desde su descripción, los sistemas lacasa mediador han sido investigados con éxito para la deslignificación y blanqueo de diferentes pastas de papel, observando una reducción del consumo de reactivos de blanqueo y una disminución de la carga contaminante de los efluentes, mientras que las propiedades mecánicas de las pastas se mantienen o mejoran. (Bourbonnais y Paice, 1996; Camarero et al., 2004; Eugenio et al., 2010a; Ibarra et al., 2006; Moldes et al., 2008). Sin embargo, el proceso aún no se ha implantado a escala industrial probablemente debido a las dificultades derivadas del uso del mediador y a la falta de optimización del proceso. El elevado coste y los posibles problemas de toxicidad de algunos mediadores han dirigido las investigaciones a la búsqueda de mediadores alternativos, incluyendo algunos metabolitos fúngicos así como productos resultantes de la degradación de la lignina (Cañas y Camarero, 2010; Fillat et al., 2010; Moldes et al., 2008) como se ha indicado anteriormente.

2.5.3 - Producción de bioetanol

El bioetanol producido a partir de materias lignocelulósicas, también llamado bioetanol de segunda generación, supone una buena alternativa a los biocombustibles de primera generación. La biomasa lignocelulósica no compite con el mercado alimentario, y, al estar ampliamente distribuida, podría obtenerse a un coste menor, lo que contribuye a disminuir el precio final del biocombustible.

Los procesos de producción de etanol basados en hidrólisis enzimática son los más prometedores, ya que evitan los problemas asociados al uso de ácidos diluidos

como son la generación de productos de degradación de la glucosa o la corrosión de los equipos y problemas medioambientales. Así, la hidrólisis enzimática permite obtener altos rendimientos de glucosa bajo condiciones de operación más suaves que la hidrólisis ácida, disminuyendo por tanto los costes de operación (Duff y Murray, 1996). Las etapas necesarias en este proceso son: pre-tratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación y destilación.

El pre-tratamiento es una etapa crucial que pretende romper las barreras físicas y químicas que inhiben la susceptibilidad del material al bioprocesado, tal como la hidrólisis enzimática y la fermentación. Este pre-tratamiento debe promover la formación de azúcares, evitar la degradación o pérdida de polisacáridos y la formación de productos inhibidores, y además, ser eficaz económicamente (Ruiz et al., 2008). Entre los pre-tratamiento estudiados, la explosión por vapor es uno de los más utilizados, ya que degrada parcialmente y solubiliza la lignina y hemicelulosas debido a las condiciones de alta presión y temperatura (Josefsson et al., 2002). Sin embargo, durante este pre-tratamiento pueden generarse compuestos inhibidores debido a reacciones de degradación, como se ha señalado anteriormente. Por ello, en muchos casos son recomendables etapas de detoxificación de los sustratos, que incluyen métodos físicos, químicos y biológicos (Palmqvist y Hahn-Hägerdal, 2000a; b). La aplicación de lacasas es uno de los nuevos métodos biológicos usados, ya que son capaces de eliminar compuestos fenólicos de la biomasa (Chandel et al., 2007; Jurado et al., 2009).

Una vez pre-tratado el material lignocelulósico, se lleva a cabo la hidrólisis enzimática. Para la fracción sólida rica en celulosa, se utilizan mezclas enzimáticas que contienen endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Las dos primeras liberan celobiosa y glucosa del sustrato a la fase líquida, mientras que las β -glucosidasas rompen la celobiosa en dos moléculas de glucosa (figura 2.18). La velocidad inicial de la hidrólisis es relativamente rápida, pero disminuye a lo largo del tratamiento debido al efecto inhibitor de los productos finales y a la pérdida de actividad de las enzimas. Por ello, es importante añadir suficiente β -glucosidasas que conviertan las moléculas de celobiosa (gran inhibidor) en glucosa, que es un compuesto menos inhibidor. En aplicaciones industriales, se suelen utilizar sistemas de hidrólisis con eliminación de azúcares, que permiten hidrolizar gran cantidad de material lignocelulósico utilizando

concentraciones más bajas de enzimas. En estos procesos, la eliminación de azúcares se lleva a cabo por ultrafiltración o sistemas de hidrólisis y fermentación simultánea.

Para llevar a cabo la hidrólisis de la fracción líquida rica en hemicelulosas, obtenida tras el pre-tratamiento, es necesaria una mezcla de enzimas que incluyan endoxilanasas y β -xilosidasas. Además, otras enzimas como α -glucuronosidasas, α -L-arabinosidasas o acetilesterasas, pueden mejorar el rendimiento de la hidrólisis (Um y van Walsum, 2010).

Durante la etapa de fermentación, los azúcares liberados durante la hidrólisis enzimática son fermentados con la consiguiente producción de etanol y CO₂. La conversión estequiométrica de la glucosa y xilosa a etanol es de 0,51 gramos de etanol por gramo de azúcar. En la práctica es muy difícil obtener conversiones tan altas ya que las levaduras derivan cierta parte de la energía que consumen hacia el metabolismo celular y el crecimiento.

El microorganismo comúnmente empleado a nivel industrial en los procesos de fermentación alcohólica es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que puede usar todo tipo de hexosas, produce etanol con unos rendimientos cercanos al máximo teórico y presenta gran tolerancia a los productos tóxicos generados durante el pre-tratamiento. No obstante, *S. cerevisiae* presenta una gran limitación cuando se quiere utilizar en la fermentación de los azúcares hemicelulósicos ya que no es capaz de fermentar eficazmente pentosas (Tomás-Pejó, 2010). Únicamente bacterias entéricas y algunas levaduras como *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *P. stipitis* son capaces de fermentar la xilosa a etanol, pero con rendimientos relativamente bajos. Además, las levaduras fermentadoras de xilosa no toleran altas concentraciones de etanol, requieren condiciones microaerófilas para su crecimiento y son muy sensibles a los inhibidores y a los cambios de pH (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

Actualmente no existen microorganismos que presenten todas las características deseables para la fermentación eficiente de los azúcares procedentes de los materiales lignocelulósicos (fermentación de hexosas y pentosas, altos rendimientos, alta productividad, tolerancia al etanol y a los inhibidores). Puesto que la utilización de forma eficiente de todos los azúcares hemicelulósicos es clave para reducir el coste de la producción de etanol, se están obteniendo microorganismos fermentadores de xilosa y hexosa mediante técnicas de ingeniería genética, ya sea por la introducción de los genes

relacionados con la producción de etanol en las bacterias entéricas como *E. coli*, o por la introducción de los genes de la ruta de la fermentación de las pentosas en microorganismos productores de etanol como la levadura *S. cerevisiae* o la bacteria etanológica *Z. mobilis* (Tomás-Pejó, 2010).



3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es evaluar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor tanto en el proceso de pasteado Kraft y blanqueo como en las propiedades finales de la pasta obtenida. Se estudiará además la hidrólisis de la fracción líquida rica en hemicelulosa obtenida en el pre-tratamiento, para su utilización como fuente de azúcares en la producción de etanol. Paralelamente, se buscará la implementación de etapas enzimáticas en dicho esquema de producción de pastas celulósicas, para estudiar su eficacia como deslignificantes y su contribución a la reducción del empleo de reactivos químicos. Además, se evaluará el efecto de la explosión por vapor en la hidrólisis enzimática de la fracción sólida, planteando la producción de etanol como alternativa a la producción de pastas celulósicas.

En todos estos tratamientos se utilizará como materia prima *Eucalyptus globulus*, por ser la especie más utilizada en la producción de pastas Kraft en España. Sin embargo, la utilización de una especie no maderera podría contribuir a reducir el consumo de reactivos químicos debido a su estructura más accesible, y plantear una alternativa en países con escasos recursos forestales. Por ello, se evaluará el uso de *Hesperaloe funifera*, especie no maderera con alto potencial papelerero, y con escasas necesidades hídricas, dentro del esquema de biorrefinería para la producción de pasta celulósica planteado.

Para alcanzar estos objetivos se han definido los siguientes objetivos concretos:

- Evaluar el efecto del proceso de explosión por vapor en la composición química y la porosimetría de astillas de *E. globulus* (Publicación I).
- Estudiar los cambios producidos en la lignina de *E. globulus* debidos a tratamientos de explosión por vapor y del sistema lacasa-mediador (Publicación II).
- Estudiar la hidrólisis de la fracción líquida obtenida en el pre-tratamiento de explosión por vapor de *E. globulus*, para evaluar su potencial en la producción de bioetanol. Estudiar así mismo, la hidrólisis de las fracciones sólidas obtenidas en el pre-tratamiento, planteando la producción de etanol como alternativa al pasteado de dichas fracciones (Publicación III).

- Estudiar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el pasteado Kraft de *E. globulus* y en la calidad de las pastas obtenidas (Publicación IV).
- Estudiar la bioblanqueabilidad con sistema lacasa-mediador de las pastas obtenidas mediante explosión por vapor y pasteado Kraft, y compararla con la de pastas Kraft convencionales (Publicación V).
- Evaluar tratamientos combinados de explosión por vapor y enzimas previos al pasteado y comparar estos resultados con los obtenidos en biopulpeo con hongos lignocelulolíticos (*Pycnoporus sanguineus* y *Trametes versicolor*) (Publicación VI).
- Estudiar la utilización de un material alternativo no maderero (*H. funifera*) para la producción de pastas celulósicas en una biorrefinería mediante el esquema explosión por vapor más pasteado Kraft y blanqueo. Evaluar además el efecto del pre-tratamiento en el biopulpeo y el bioblanqueo con sistema lacasa mediador (Publicación VII).

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis doctoral están recogidos en una serie de publicaciones que se indican a continuación:

- I. Martín-Sampedro, R., Martín, J.A., Eugenio, M.E., Revilla, E., Villar, J.C. Steam explosion treatment of *Eucalyptus globulus* wood: Influence of operational conditions on chemical and structural modifications. *BioResources*. 2011. 6(4): 4922-4935.
- II. Martín-Sampedro, R., Capanema, E.A., Hoeger, I.C., Villar, J.C., Rojas, O.J. Lignin changes after steam explosion and laccase-mediator treatment of eucalyptus wood chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59(16): 8761-8769.
- III. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., García, J.C., Lopez, F., Villar, J.C., Diaz, M.J. Steam explosion and enzymatic treatments as pre-treatments to improve enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*. *Manuscrito*.
- IV. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Revilla, E., Martín, J.A., Villar, J.C. Integration of Kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment. *BioResources*. 2011. 6(1): 513-528.
- V. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C. Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips. *Bioresource Technology*. 2011. 102: 4530-4535.
- VI. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Carbajo, J.M., Villar, J.C. Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Bioresource Technology*. 2011. 102: 7183-7189.
- VII. Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C. Effect of steam explosion and enzymatic pre-treatments on pulping and bleaching of *Hesperaloe funifera*. *Manuscrito*.

Todas las publicaciones están relacionadas entre sí y contribuyen al estudio del sistema de biorrefinería forestal indicado en la figura 4.1. que se basa en la adición de una etapa de pre-extracción de hemicelulosas previa al pasteado. Además, se ha estudiado la adición de etapas enzimáticas que mejoren tanto el pasteado y el blanqueo, como la hidrólisis, para contribuir a la sostenibilidad del proceso y reducir su impacto ambiental.

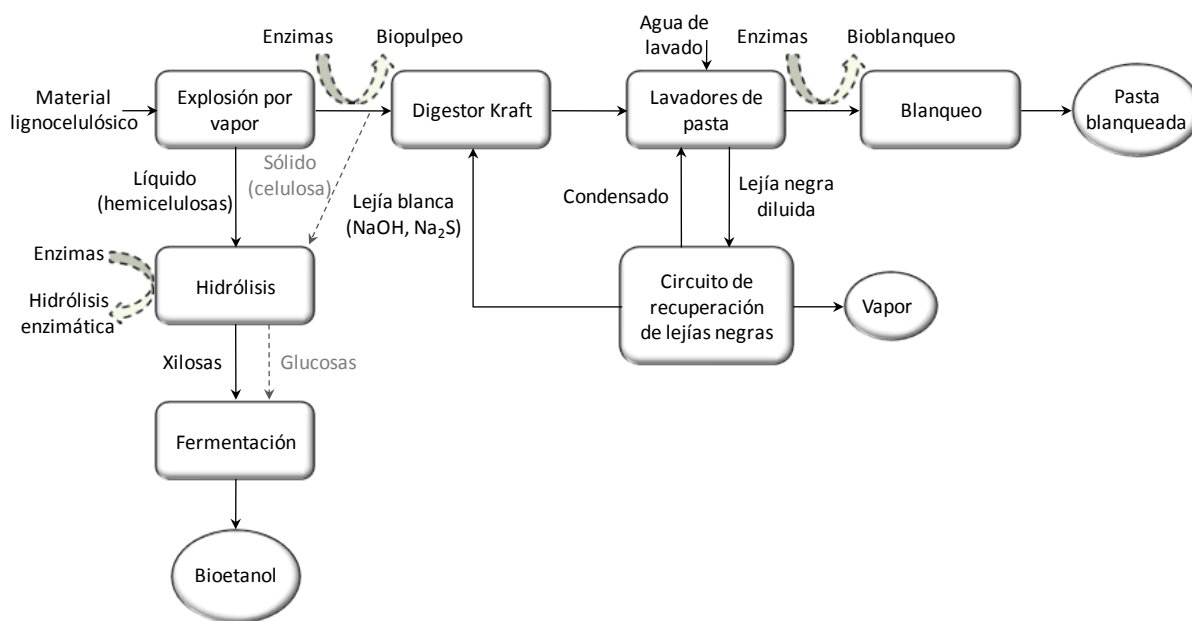


Figura 4.1. Esquema del proceso estudiado en la presente tesis doctoral: biorrefinería basada en la extracción de hemicelulosas previa al pasteado Kraft, introduciendo etapas enzimáticas que mejoren la sostenibilidad del proceso.

A continuación se discuten conjuntamente los resultados obtenidos en los distintos trabajos. Para ello se seguirán los siguientes puntos:

- 4.1) Cambios químicos y estructurales originados por el pre-tratamiento de explosión por vapor, incluyendo los cambios causados en la lignina (Publicaciones I y II).
- 4.2) Hidrólisis enzimática de las fracciones líquida y sólida generadas en el pre-tratamiento de explosión por vapor. Incluye el aprovechamiento de la fracción líquida para la producción de etanol y el estudio de la hidrólisis enzimática de la fracción sólida, como alternativa al pasteado (Publicación III).

- 4.3) Efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el pasteado Kraft y en el bioblanqueo (Publicación IV y V).
- 4.4) Combinación de tratamientos de explosión por vapor y sistema lacasa mediador antes del pasteado como alternativa al biopulpeo con hongos ligninolíticos (Publicación VI).
- 4.5) Utilización de *Hesperaloe funifera* en el esquema de biorrefinería planteado, y evaluación del efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el biopulpeo y el bioblanqueo con LMS (Publicación VII).

4.1 - Cambios químicos y estructurales debidos al pre-tratamiento de explosión por vapor

En este apartado se incluye el estudio de los cambios químicos y estructurales causados por el pre-tratamiento de explosión por vapor en astillas de *E. globulus*. Para el estudio de los cambios químicos se ha determinado la composición química de las distintas muestras sólidas y se han realizado análisis termogravimétricos de las mismas (Publicación I y II). Además, se ha caracterizado por resonancia magnética nuclear (RMN) la lignina aislada de las muestras antes y después del pre-tratamiento (Publicación II). Este estudio se completó con el análisis de una muestra sometida a un tratamiento en serie de explosión por vapor y tratamiento LMS. Este tratamiento en serie pretende mejorar el proceso de pasteado (biopulpeo) como se estudiará en el apartado 4.4. Además, puede contribuir a la detoxificación de la fracción sólida antes de su hidrólisis enzimática (apartado 4.2.2). Por último, para determinar los cambios estructurales sufridos por las astillas, se han determinado la capacidad de retención de agua, la porosidad relativa y el área superficial de las astillas antes y después de los diferentes pre-tratamiento de explosión por vapor (Publicación I).

En la figura 4.2 se indica en qué partes del proceso de biorrefinería forestal se centra este apartado.

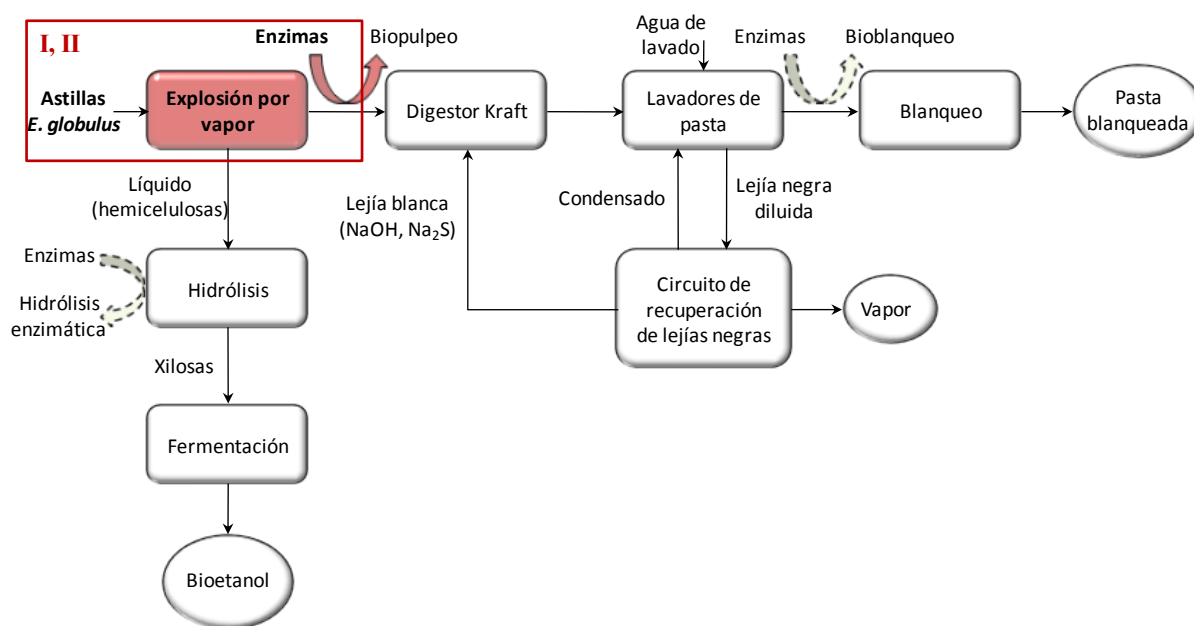


Figura 4.2. Esquema del proceso de biorrefinería forestal estudiado, indicando las partes del proceso en las que se centran las publicaciones I y II.

Para estudiar el pre-tratamiento de explosión de vapor se llevó a cabo un diseño experimental con 2^3 experimentos. Las variables consideradas fueron: la adición o no de una pre-extracción (impregnación de la madera con agua a 25°C durante 16 horas), la duración del primer ciclo de tratamiento de explosión por vapor (5 o 10 minutos) y la adición o no de un segundo ciclo de 3 minutos de duración. Se fijó una temperatura de 183°C para todos los tratamientos con vapor (10 Kg/cm² de presión) y una presión de descarga o explosión de 6 Kg/cm². La tabla 4.1 recoge las condiciones de operación de los distintos pre-tratamientos. Se utilizaron dos controles: EG que corresponde al *E. globulus* sin ningún tratamiento y SE0 que corresponde a la madera tras la pre-extracción pero sin tratamiento de explosión por vapor.

Tabla 4.1. Condiciones de operación de los pre-tratamientos de explosión por vapor realizados.

Experimento	Pre-extracción con agua a 25°C	Número de ciclos	Duración del 1 ^{er} ciclo (min)	Factor de severidad (S_0)
EG	No	-	-	-
SE0	Sí	-	-	-
SE1	No	1	5	3,14
SE2	Sí	1	5	3,14
SE3	No	1	10	3,44
SE4	Sí	1	10	3,44
SE5	No	2	5	3,35
SE6	Sí	2	5	3,35
SE7	No	2	10	3,56
SE8	Sí	2	10	3,56

La fracción sólida obtenida tras el pre-tratamiento más intenso (SE8) fue sometida a un tratamiento en serie con LMS a 70°C, pH 6 (tampón fosfato) y en presencia de oxígeno (SE8+LMS), para evaluar el efecto de dicho tratamiento tanto en el biopulpeo como en la detoxificación de la fracción sólida, como se ha indicado anteriormente.

Después de cada pre-tratamiento, se determinó la composición química de las fracciones líquidas y sólidas obtenidas. Además, la fracción sólida se estudió mediante análisis termogravimétrico para determinar la influencia de la severidad del pre-tratamiento en la temperatura de degradación de cada componente de la madera. Los

cambios inducidos por el pre-tratamiento en la lignina fueron estudiados mediante análisis RMN de la lignina aislada a partir de una muestra antes y después de los tratamientos SE8 y SE8+LMS.

Se estudiaron además los cambios sufridos en las fracciones sólidas en cuanto a capacidad de retención de agua, para determinar la accesibilidad del material. También se estudió mediante porosimetría de intrusión de mercurio la distribución del volumen de poros y el área superficial según el tamaño de poro, para evaluar los cambios estructurales inducidos por los distintos pre-tratamientos.

4.1.1 - Cambios en la composición química

La composición química de las astillas de *E. globulus* antes de ningún tratamiento (EG) y de las fracciones sólidas obtenidas tras los distintos pre-tratamientos (SE0-SE8), se determinó en base al contenido en extractos, lignina, grupos acetilo y azúcares. A partir de estos datos, recogidos en las publicaciones I, II y III, y teniendo en cuenta el rendimiento en base sólida del pre-tratamiento, se determinaron los porcentajes de cada componente que permanecen en la fracción sólida obtenida tras la explosión por vapor. En la figura 4.3 se recogen los porcentajes medios correspondientes a las distintas repeticiones de los experimentos llevados a cabo en cada publicación.

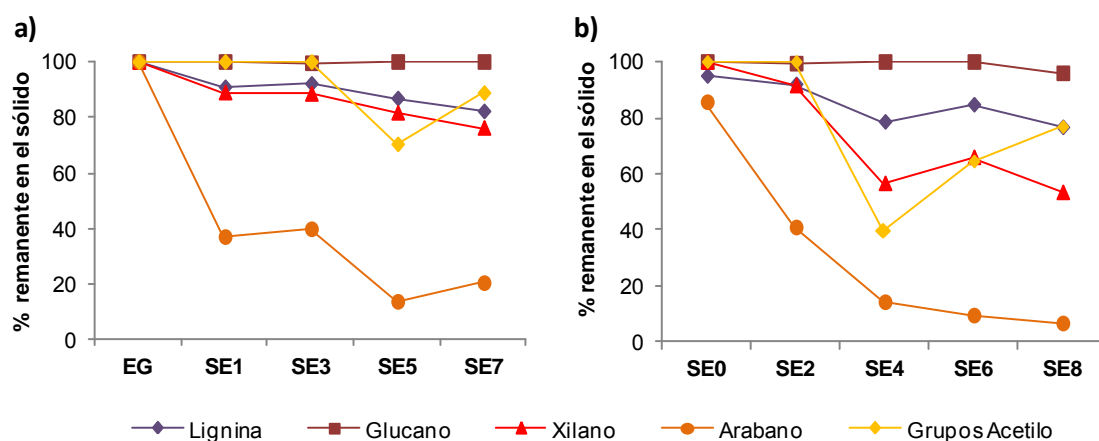


Figura 4.3. Porcentaje de cada componente de la madera que se detectó en la fracción sólida tras la explosión por vapor, respecto a la materia prima original EG: a) pre-tratamientos sin pre-extracción previa; b) pre-tratamientos con pre-extracción previa.

El principal efecto del tratamiento de explosión por vapor fue la solubilización de las hemicelulosas (xilanos y arabanos) provocadas por la autohidrólisis durante el tratamiento con vapor a altas temperaturas. Al igual que en trabajos publicados por otros autores (Josefsson et al., 2002; Li et al., 2005; 2007), se observó un aumento de la hidrólisis de hemicelulosas al aumentar la severidad del tratamiento (aumento de la temperatura y el tiempo de tratamiento). Así en el tratamiento más severo (SE8) sólo permaneció en la fracción sólida el 53,4% de los xilanos y el 6,6% de los arabanos. Ruiz et al. (2008) encontraron resultados similares, observando una solubilización completa de los arabanos y del 50% de los xilanos tras someter tallos de girasol a un tratamiento de explosión por vapor a 190°C.

Junto con la solubilización de hemicelulosas se observó una eliminación de grupos acetilo para severidades medias y altas (de SE4 a SE8), ya que éstos se encuentran unidos a los xilanos en las hemicelulosas de las maderas frondosas, como el eucalipto. Otros autores también han observado una disminución de los grupos acetilo tras tratamientos de autohidrólisis (Leschinsky et al., 2009). Estos grupos acetilo pueden eliminarse de la madera por medio de dos mecanismos: por hidrólisis directa, o por disolución de los xilo-oligosacáridos acetilados (Maloney et al., 1985).

La explosión por vapor también puede originar un ablandamiento y despolimerización de la lignina (Excoffier et al., 1991), provocando la solubilización de una pequeña parte de la lignina presente en el material original. Se observó que su eliminación también aumentaba con la severidad del tratamiento. Por el contrario, no se observó solubilización de la celulosa, excepto un 4% para el tratamiento SE8. Similares resultados fueron encontrados por otros autores, quienes observaron hidrólisis de la celulosa, principalmente en regiones amorfas, sólo para tratamientos de severidad superior a los estudiados en esta tesis doctoral (Li et al., 2005; Ruiz et al., 2008; Tunc et al., 2010).

La pre-extracción con agua a 25°C de las astillas de *E. globulus* no afectó significativamente a su composición cuando no se llevó a cabo una explosión por vapor consecutiva (EG-SE0), excepto una disminución en el contenido en extractos totales (3,8% vs 2,7%) (ver publicación Publicación I). Sin embargo, al llevar a cabo la explosión por vapor sí se observaron diferencias debidas a esta pre-extracción, especialmente en los tratamientos de mayor severidad (SE3-SE4 y SE7-SE8),

aumentando la cantidad solubilizada de todos los componentes de la madera. Esto puede deberse a que la eliminación de extractos durante la pre-extracción facilita la penetración del vapor en las astillas haciendo más eficaz el tratamiento. Otra razón podría ser el mayor contenido en agua de las muestras pre-extraídas, que puede provocar una explosión más intensa debido al vapor generado a partir del agua de las muestras.

Cuando no se realizó una pre-extracción inicial, la adición de un segundo ciclo de explosión por vapor fue un factor más influyente en la solubilización de los componentes de la madera que la prolongación del primer ciclo, (SE3-SE5). Sin embargo, la cantidad extraída de lignina, xilano y grupos arabanos fue mayor en SE4 que en SE6, indicando mayor influencia del tiempo de tratamiento frente a la adición de un segundo ciclo cuando se llevó a cabo una pre-extracción inicial. Es decir, el efecto global del pre-tratamiento dependerá de las tres variables de operación estudiadas, y su combinación determinará la influencia de cada variable.

En la fracción líquida obtenida después de la pre-extracción (SE0) no se observó apenas presencia de monómeros ni oligosacáridos. Sin embargo, en las fracciones obtenidas después de los tratamientos de explosión por vapor (SE1-SE8), el contenido de ambos, y especialmente el de oligosacáridos, aumentó al aumentar la severidad del tratamiento. En la figura 4.4 se muestran los porcentajes de cada componente de la madera, presentes en la fracción líquida. Como se observó a partir de la fracción sólida, la celulosa apenas se extrajo mientras que la extracción de hemicelulosas (xilano, arabano y grupos acetilo) aumentó al aumentar la severidad del tratamiento. Sin embargo, la cantidad detectada en la fracción líquida fue inferior a la cantidad extraída determinada a partir del análisis de la fracción sólida. Varios autores han observado la degradación de oligosacáridos disueltos en la fracción líquida a furfural e hidroximetilfurfural (HMF) durante tratamientos de explosión por vapor de severidad superior a 3,5 y 4,3 respectivamente (Li et al., 2005), lo que explicaría la disminución de oligosacáridos presentes en la fracción líquida. Sin embargo, los tratamientos de explosión por vapor llevados a cabo en esta tesis doctoral tienen factores de severidad iguales o inferiores a 3,5 y en las fracciones líquidas obtenidas no se detectó presencia de furfural ni HMF, lo que indicaría un bajo porcentaje de reacciones de degradación. No obstante, es posible que estos productos de degradación volátiles no se recuperen cuantitativamente en la fracción líquida y se pierdan parcialmente a la atmósfera durante

la descompresión de la explosión por vapor (Emmel et al., 2003). Otra posible causa de la disminución de los azúcares recuperados podría ser una recolección ineficiente de los compuestos extraídos, ya que parte podrían estar disueltos en el líquido que impregna las astillas después de la explosión y ser desechados con las aguas del lavado de las astillas.

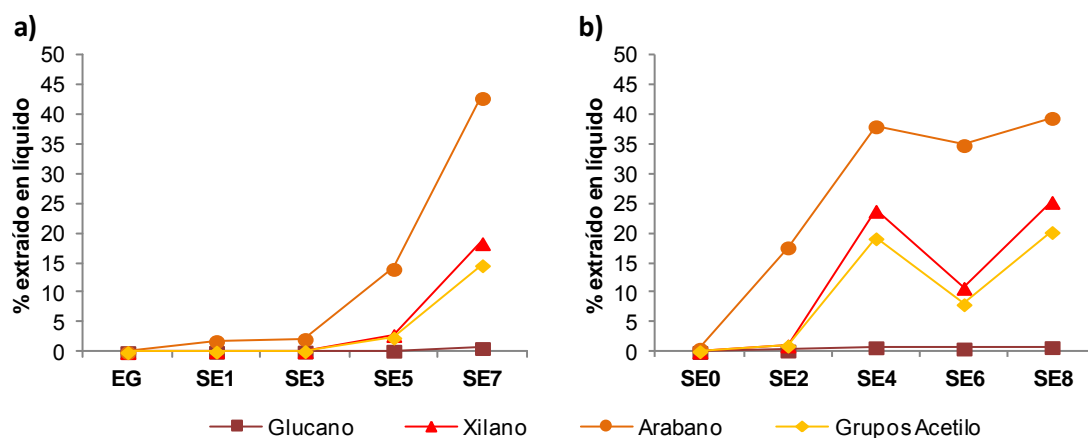


Figura 4.4. Porcentaje de cada componente de la madera que se detectó en la fracción líquida tras la explosión por vapor, respecto a la materia prima original EG: a) pre-tratamientos sin pre-extracción previa; b) pre-tratamientos con pre-extracción previa.

La fracción sólida obtenida tras el pre-tratamiento SE8, que proporcionó una mayor extracción de hemicelulosas y una estructura más abierta comparado con los demás pre-tratamientos, como se verá en los siguientes apartados, se sometió a un tratamiento con LMS a 70°C durante 30 minutos con saturación de oxígeno y se estudió su composición química (Publicación II y III). La cantidad de cada componente que permaneció en la fracción sólida después de los tratamientos SE8+LMS, respecto a la muestra original de *E. globulus* (EG) fue: 74%, 93%, 45%, 5% y 32% de lignina, glucano, xilano, arabano y grupos acetilo respectivamente. Es decir, se observó una pequeña solubilización de todos los componentes de la madera durante el tratamiento enzimático, excepto para los grupos acetilos, en los que la solubilización fue más acusada, seguida por la eliminación de xilanos. Esta solubilización puede deberse a la degradación parcial de los componentes de la madera, principalmente hemicelulosas (formadas por xilanos, arabanos y grupos acetilo) durante el tratamiento de explosión por vapor SE8, que hace que sean solubles en el subsecuente tratamiento enzimático a 70°C. Sin embargo, los resultados obtenidos cuando no se añadió LMS y se llevó a cabo el tratamiento sólo con tampón (pH 6, 70°C) fueron muy similares, por lo que esta

solubilización se debe principalmente al tratamiento a alta temperatura y no a la acción de las enzimas. Por otro lado, se observó una disminución en el contenido de extractos en etanol comparando las muestras SE8+LMS y SE8 (5,6% y 8,3% respectivamente), que podría estar relacionado con la eliminación de extractos lipofílicos por la lacasa, ya observado por otros autores que aplicaron lacasas para combatir problemas de pitch en la producción de pasta y papel (Gutiérrez et al., 2007; Widsten y Kandelbauer, 2008; Yang y Wyman, 2004; Zhang et al., 2005).

4.1.2 - Estudio termogravimétrico

Se llevaron a cabo análisis termogravimétricos (TGA) de las fracciones sólidas obtenidas después de los tratamientos de explosión por vapor. En la figura 4.5 se muestran las curvas de pérdida de peso en atmósfera de aire frente a la temperatura y sus curvas derivadas tanto para la madera original (EG) como para la fracción sólida obtenida tras el tratamiento de explosión de vapor más severo (SE8). Se observaron dos franjas principales de degradación, la primera entre 250 y 350°C corresponde a la degradación de los polisacáridos, mientras que la segunda, entre 400 y 500 °C, se atribuye a la lignina (Rovira y Vallejo, 2000). En el caso de los polisacáridos la degradación se produce por medio de dos reacciones consecutivas: una primera descomposición térmica (volatilización) seguida de la oxidación de los compuestos formados durante la descomposición térmica. En el caso de la lignina, se considera que estas reacciones tienen lugar simultáneamente (Barneto et al., 2009).

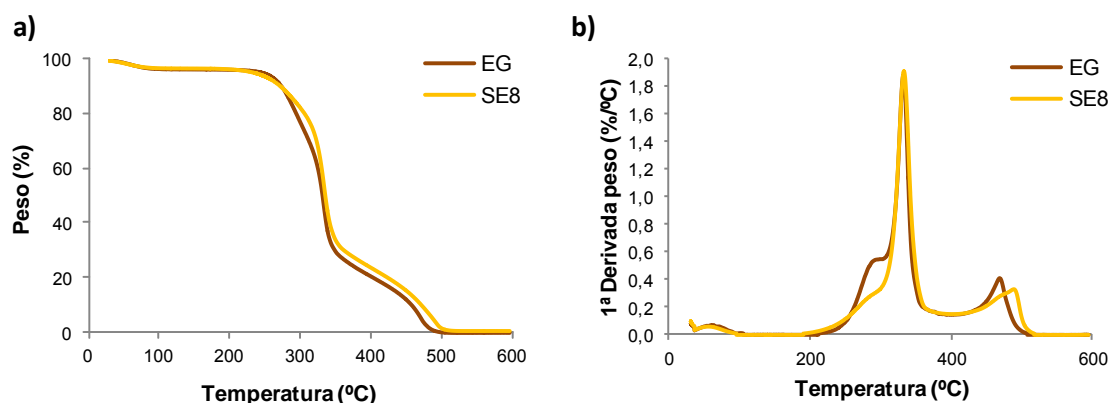


Figura 4.5. Análisis termogravimétrico, en atmósfera de aire, de la madera original (EG) y después del tratamiento de explosión de vapor (SE8): a) pérdida de peso frente a la temperatura; b) primera derivada de la curva de pérdida de peso.

A partir de la primera derivada de las curvas de pérdida de peso, se puede determinar la temperatura de degradación media para cada polímero (figura 4.6). Los cambios en estas temperaturas de degradación se pueden atribuir a cambios en los componentes de la madera. Así, mientras la temperatura de degradación de los polisacáridos permaneció aproximadamente constante, se observó un aumento progresivo de la temperatura de degradación de la lignina a medida que el tratamiento de explosión por vapor se hizo más severo, llegando a 489 °C para SE8 (frente 470°C en EG). Comparando los distintos tratamientos, se observó un aumento de la temperatura de degradación de la lignina al añadir un segundo ciclo de tratamiento (SE1-SE4, SE2-SE5, SE3-SE6 y SE4-SE8) o al aumentar la duración del primer ciclo (SE1-SE3, SE2-SE4, SE6-SE8, excepto para SE5-SE7). Generalmente, cuanto menor sea el peso molecular y/o la cristalinidad, menor será la temperatura de degradación de un polímero (Turi, 1981). Por tanto, el aumento en la temperatura atribuida a la lignina sugiere que durante la explosión por vapor tienen lugar reacciones de condensación, que son más frecuentes cuanto mayor es la severidad del tratamiento (Li et al., 2007). Este aumento de temperatura de degradación de la lignina, también podría atribuirse a la eliminación de complejos lignina-carbohidratos (LCC) observada por otros autores durante la explosión por vapor (Li et al., 2007) y que se confirmó con el estudio de la lignina mediante RMN descrito en el siguiente apartado.

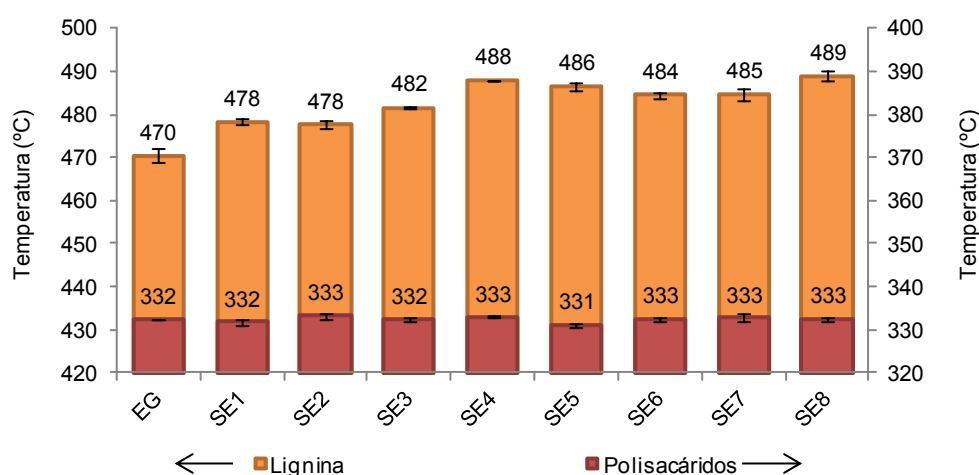


Figura 4.6. Temperaturas de degradación atribuidas a la lignina y a los polisacáridos en las muestras analizadas antes (EG) y después del tratamiento de explosión por vapor (SE1-SE8).

Respecto a los polisacáridos, la temperatura de degradación atribuida a la celulosa permanece aproximadamente constante después de la explosión por vapor

(332-333 °C). Sin embargo, fijándonos en las curvas correspondientes a la primera derivada de la pérdida de peso, se observó un hombro en torno a 280°C en la muestra original (EG) que fue desapareciendo progresivamente al aumentar la severidad de los tratamientos de explosión por vapor. Este hombro se atribuyó a los xilanos, y su desaparición concuerda con la solubilización de éstos, observada a partir de los análisis de la composición química (figura 4.3).

Cuando la muestra SE8 se sometió a un tratamiento con LMS a 70°C, las temperaturas de degradación de la lignina y de los polisacáridos disminuyeron en 19 y 31°C respectivamente. Cambios similares se observaron en la muestra control tratada sólo con tampón a 70°C (sin adición de LMS). Por tanto, al igual que ocurría al analizar la composición química de las muestras, los cambios originados por el tratamiento enzimático se deben principalmente al tratamiento a temperatura alta en presencia de oxígeno y no a la acción enzimática. Así, durante este tratamiento, pequeños fragmentos de lignina y polisacáridos (parcialmente degradados durante la explosión por vapor) pueden solubilizarse pasando a la fase líquida (como se ha indicado en el apartado 4.1.1) y causar una disminución en el grado de polimerización de los polisacáridos y en el contenido en lignina, que provocaría la disminución de sus temperaturas de degradación.

4.1.3 - Cambios en las estructuras de lignina

Para estudiar los cambios sufridos por la lignina durante el tratamiento de explosión por vapor, se aisló lignina de la muestra original (EG) y de la fracción sólida obtenida después del tratamiento más severo (SE8) y se analizó mediante RMN. También se estudiaron los posibles cambios inducidos por un tratamiento consecutivo de SE8 y LMS a 70°C, aislando lignina de la muestra SE8+LMS estudiada en los apartados anteriores. El procedimiento seguido para aislar la lignina fue un procedimiento modificado de Milled Wood Lignin (MWL), descrito previamente por Capanema et al. (2007) y que se detalla en la publicación II. Durante dicho procedimiento, se ajustó la intensidad de molienda (tiempo de molienda y relación bolas por gramo de muestra) para conseguir un rendimiento en el aislamiento de lignina en torno al 40%, siendo necesaria una molienda más intensa para la muestra SE8. Tras el

tratamiento con lacasa, la intensidad de la molienda requerida se redujo. Teniendo en cuenta que una lignina menos condensada es más fácil de aislar, estos resultados coinciden con los vistos en el análisis termogravimétrico. Dichos análisis indicaban una condensación de la lignina durante el tratamiento de explosión de vapor y una reducción de esta condensación durante el subsiguiente tratamiento con LMS debido a reacciones de despolimerización.

Las tres ligninas aisladas se analizaron mediante ^1H - ^{13}C 2D-RMN. A través de la asignación de las diferentes señales en los espectros, comparadas con las de MWL de eucalipto reportadas en otros trabajos (Capanema et al., 2004; 2005), pudieron identificarse las unidades estructurales (G y S) y los diferentes enlaces entre ellas (figura 4.7). Los espectros HSQC mostraron las tres regiones típicas de un espectro de lignina: región alifática (CH saturado), alifática oxigenada (CH saturado unido a oxígeno) y aromática (principalmente CH aromático pero también CH olefínico) (figuras 4.8, 4.9 y 4.10).

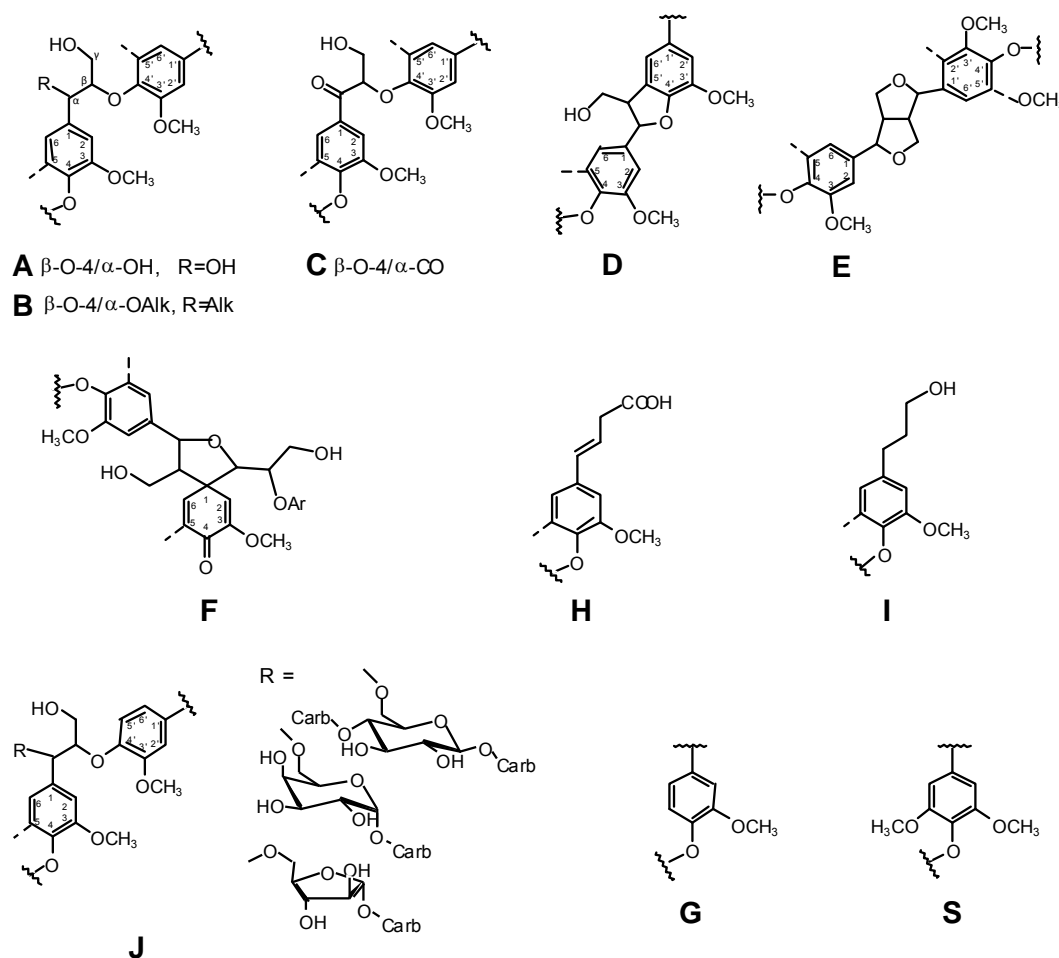


Figura 4.7. Estructuras de lignina identificadas mediante RMN.

En la región alifática de las tres muestras se observaron señales en torno a δ_H 0,8 y δ_H 1,2-1,3, que corresponden a extractos, probablemente unidos químicamente a la lignina (Balakshin et al., 2001). Se observó un conjunto de señales entre δ_H 1,5-2,5 y δ_C 20-43 que corresponden a CH alifático unido a alcoholes, carbonilos o éteres (Balakshin et al., 2001). Se identificaron también algunas estructuras menores de lignina, como Ar-COCH₂-CH₂OH y ácido dihidroferúlico (Ar-CH₂-CH₂-COOH). En la lignina aislada de la muestra original de *E. globulus* se identificaron señales correspondientes a alcohol dihidrocinámico (Ar-CH₂-CH₂-CH₂OH) (estructura **I**), que no se observaron en las ligninas aisladas a partir de las muestras tratadas.

En la región alifática oxigenada de los espectros de las tres ligninas aisladas, se identificaron señales correspondientes a las estructuras principales de la lignina nativa como subestructuras de tipo (β -O-4') (**A**), fenilcumarano (β -5') (**D**) y pino/siringaresinol (β - β') (**E**), aunque la intensidad de las estructuras β -O-4' y β - β' disminuyó en las muestras después de la explosión por vapor. Se observaron también en las tres ligninas las señales correspondientes al β -CH en subestructuras β -O-4' con unidades S y grupos carbonilo en α -C a δ_C/δ_H 83,5/5,28 (**C β**), y el γ -CH en unidades de coniferil alcohol a 61,9/4,12 ppm (Capanema et al., 2005).

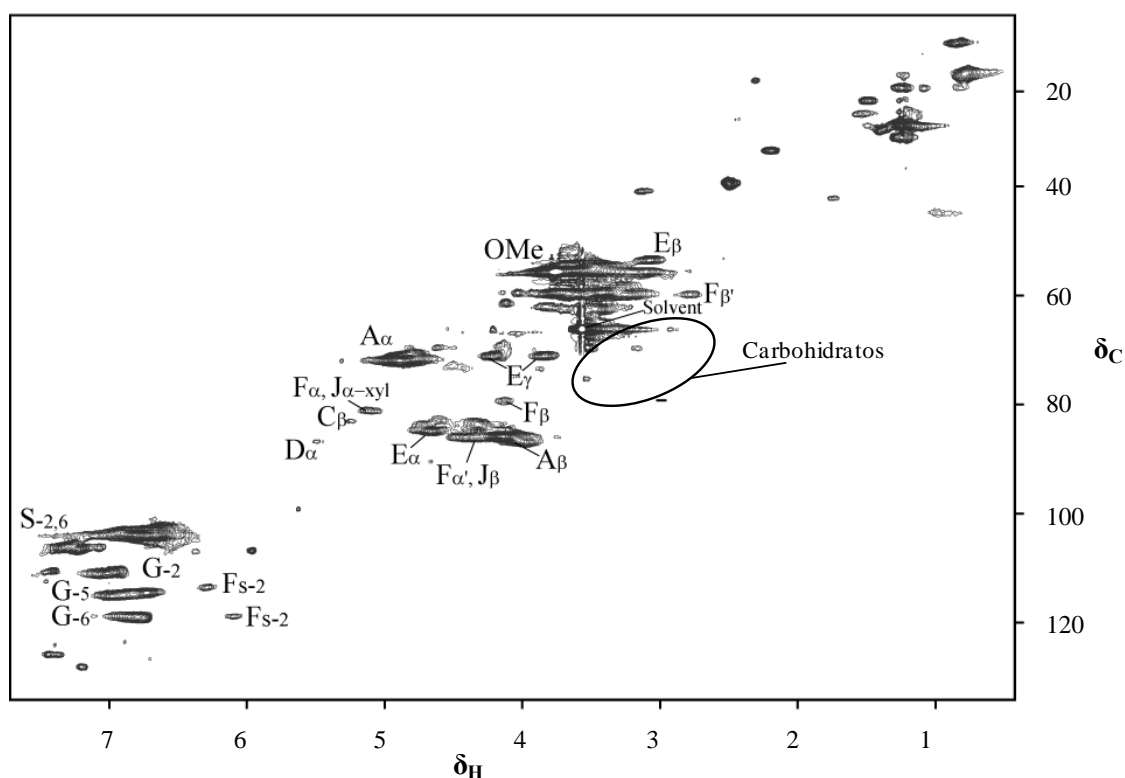


Figura 4.8. Espectro HSQC de la lignina MWL aislada de la muestra original de *Eucalyptus globulus*.

En el espectro de la lignina aislada de *E. globulus* sin tratar se identificaron señales débiles correspondientes a subestructuras de espirodienona (**F**). Las señales a δ_C/δ_H 79,5/4,12 y 81,2/5,1 ppm se asignaron a β' -CH en estructuras de espirodienona (**F_β**) y α -CH en espirodienona (**F_α**) y lignina unida a xilano (**J_{α-xyI}**), respectivamente (Capanema et al., 2005; Capanema et al., 2007). Estas señales se debilitaron, hasta incluso desaparecer en las ligninas aisladas después de la explosión por vapor y después del tratamiento en serie de explosión por vapor y LMS. Las señales de subestructuras β -O-4' unidas a carbohidratos mediante enlaces éteres en α -C o γ -C, revelan la presencia de complejos lignina – carbohidratos (**J**). La disminución de intensidad de la señal 81,2/5,1 ppm asignada a enlaces bencil éter entre lignina y xilano (**J_{α-xyI}**), corrobora la hipótesis de la eliminación de complejos lignina – carbohidratos (Capanema et al., 2007) durante la explosión por vapor, señalada en el estudio termogravimétrico.

En la región aromática de las tres ligninas se observó un predominio de las unidades siringilo (**S**) respecto a las guayacilo (**G**), lo que concuerda con la alta proporción de unidades S en las maderas de frondosas.

Comparando los espectros HSQC de las tres ligninas aisladas, se encontró una mayor presencia de polisacáridos en las ligninas tratadas (SE8 y SE8+LMS) a δ_C/δ_H 63-75/3,2-3,8. Aparte de esta diferencia, los espectros fueron muy similares. Otros autores que estudiaron lignina residual después de un tratamiento LMS seguido de una extracción alcalina (Balakshin et al., 2001; Ibarra et al., 2007), encontraron también espectros HMQC muy similares a los de la lignina original (lignina Kraft residual). Estos autores atribuyeron estos resultados a la eliminación de la lignina alterada de la pasta durante la extracción alcalina llevada a cabo tras el tratamiento LMS. Así, la lignina que permanece en la pasta no muestra cambios sustanciales, porque sería principalmente la lignina no oxidada. En nuestro caso, la lignina alterada podría eliminarse durante la extracción alcalina que se lleva a cabo en el procedimiento de aislamiento de la lignina con el objetivo de eliminar taninos. Así, la lignina soluble en álcali eliminada en el caso de muestra original fue un 9,6% de la lignina inicial, mientras que para la muestra tras explosión de vapor fue un 26,9%. En el caso de la muestra tras explosión de vapor y tratamiento LMS, la lignina soluble en álcali fue un 25,0% de la lignina inicial. Esta disminución respecto a la muestra SE8 puede deberse a la eliminación de lignina durante el tratamiento LMS, que se observó en el estudio de la composición química.

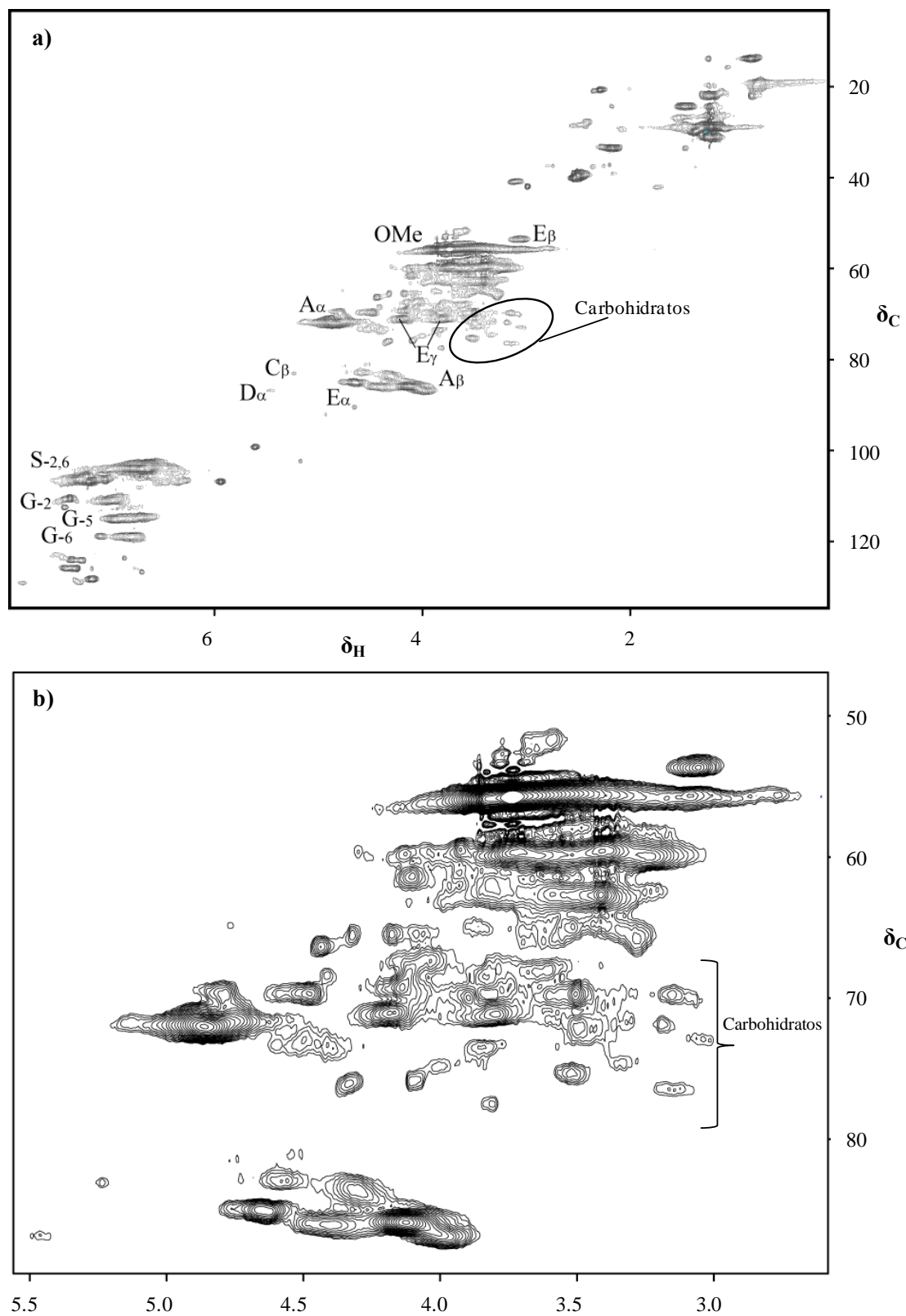


Figura 4.9. Espectro HSQC de la lignina aislada de la muestra tras el tratamiento de explosión por vapor SE8 (a). Incluye una ampliación de la región alifática oxigenada (b).

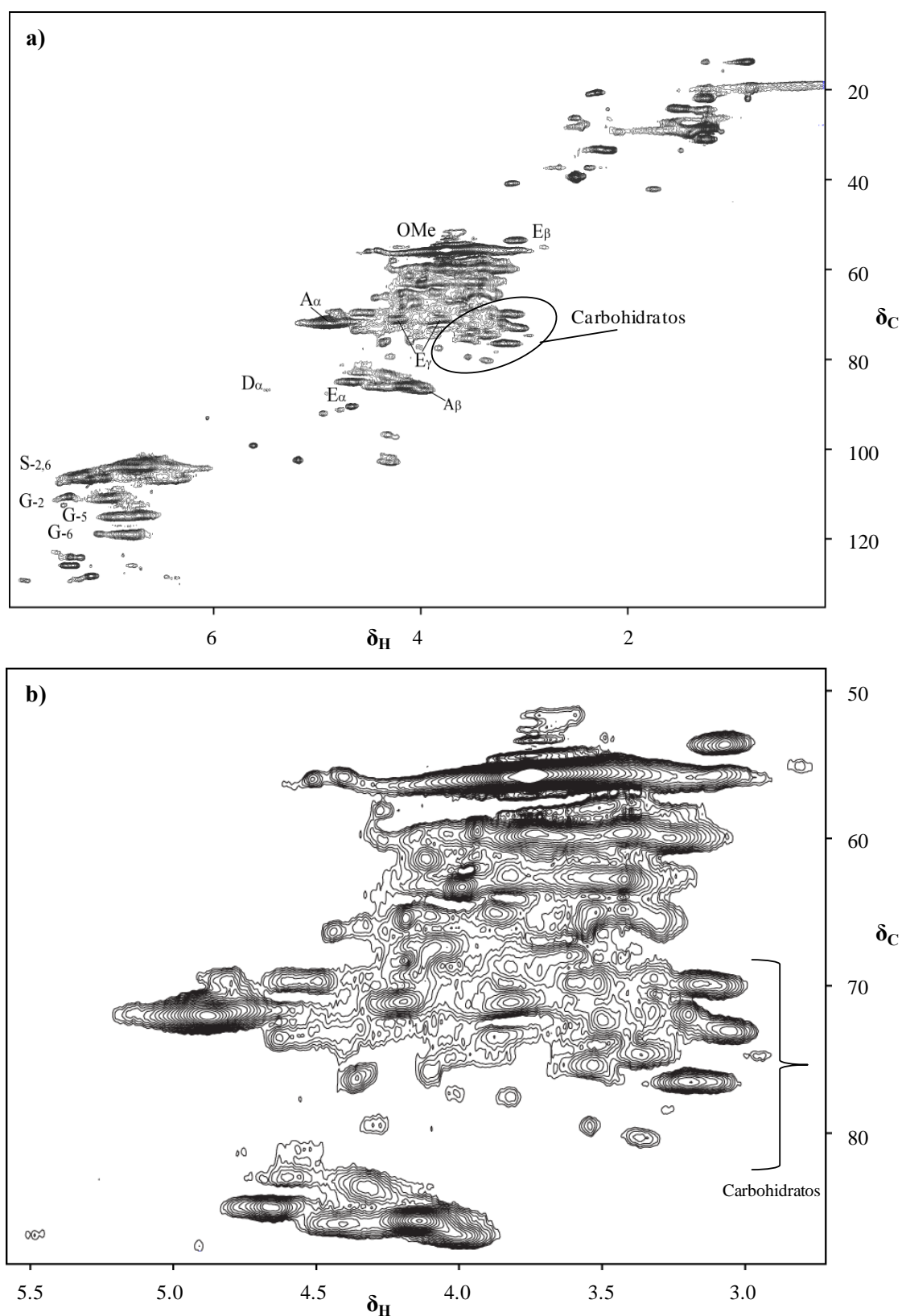


Figura 4.10. Espectro HSQC de la lignina aislada de la muestra tras el tratamiento de explosión por vapor seguido del tratamiento con LMS (SE8+LMS) (a). Incluye una ampliación de la región alifática oxigenada (b).

A partir de los espectros ^{13}C -RMN se llevó a cabo un estudio cuantitativo de los grupos funcionales principales en la lignina. Los cálculos se hicieron de acuerdo al método propuesto por Capanema et al. (2005), y los resultados se muestran en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Grupos funcionales más importantes en la lignina, basados en ^{13}C NMR (por 100 unidades aromáticas Ar).

Lignina aislada	COOR	OH _{pr} *	OH _{sec} *	OH _{ph}	β -O-4	OMe	S/G	DC
Original (EG)	5	69	57	23	64	177	3,2	13
SE8	16	66	54	47	36	170	3,1	14
SE8 + LMS	17	63	70	53	36	161	3,0	19

*Incluyen grupos OH de los carbohidratos.

La cantidad de grupos COOH alifáticos y conjugados estimada a partir del espectro de la lignina MWL no acetilada de la muestra original *E. globulus* (EG) fue similar a la reportada por otros autores (Evtuguin et al., 2001). Sin embargo, al someter la madera a un tratamiento de explosión por vapor, la cantidad de grupos carboxílicos aumentó significativamente.

La cantidad de grupos hidroxilo primarios, observada en las ligninas aisladas a partir de las muestras tratadas (SE8 y SE8+LMS), fue ligeramente inferior a la de la lignina aislada de la muestra original (EG). Sin embargo, la cantidad de OH secundarios aumentó significativamente después del tratamiento con lacasa. Además, la cantidad de OH fenólicos aumentó apreciablemente después del tratamiento de explosión por vapor, coincidiendo con los resultados encontrados por otros autores (Robert et al., 1986; Shimizu et al., 1998).

La cantidad de subestructuras β -O-4 se redujo significativamente después del tratamiento de explosión de vapor, concordando con los resultados mostrados por otros autores (Jakobsons et al., 1995; Li et al., 2007; Robert et al., 1988). Como se ha indicado en el apartado 2.4.2 de la introducción, cuando el tratamiento de explosión por vapor se lleva a cabo sólo en presencia de vapor, se produce una autohidrólisis catalizada por el ácido acético formado a partir de los grupos acetilos de la madera. Las reacciones predominantes en la lignina son la fragmentación por acidólisis de los enlaces β -O-4 y la polimerización por reacciones de condensación entre el C₆ o C₅ aromático y un ión carbonio, normalmente localizado en α -C (Li et al., 2007). Estos

autores observaron un aumento del peso molecular de la lignina, que presentó una estructura más heterogénea, debido al predominio de las reacciones de repolimerización a medida que aumentaba la severidad del tratamiento. En nuestro caso, no se observó un aumento del grado de condensación (DC) después del tratamiento de explosión por vapor, probablemente debido a que, en las condiciones ensayadas (menos severas), las reacciones de repolimerización pueden no ser predominantes.

Después del tratamiento con LMS, no se observó variación en la cantidad de subestructuras β -O-4, pero se observó un aumento en el grado de condensación. Por el contrario, los análisis termogravimétricos indicaban una disminución de la temperatura de degradación de la lignina que estaría asociada a estructuras menos condensadas de lignina. Sin embargo, se debe tener en cuenta que para los análisis termogravimétricos se utilizó madera molina y no lignina aislada, por tanto, estos resultados se verán afectados por cambios indirectos y colectivos de la lignina y otros componentes de la madera. Así, los resultados indican una disminución global del peso molecular de la lignina después del tratamiento de explosión por vapor y LMS, siendo la lignina de menor peso molecular extraída durante la extracción alcalina (como se ha visto anteriormente) y quedando la lignina más condensada como lignina aislada.

La cantidad de grupos metoxilo (OMe) se redujo de 1,77/Ar a 1,70/Ar después del tratamiento de explosión por vapor, y de 1,70/Ar a 1,61/Ar en el subsiguiente tratamiento con LMS. Reducciones similares fueron encontradas por otros autores durante tratamientos de autohidrólisis (Chua y Wayman, 1979).

Por último, se observó una reducción significativa de la relación S/G después del tratamiento de explosión por vapor y también después del tratamiento con LMS. Chua y Wayman (1979) explicaron que esta reducción en la relación S/G durante condiciones suaves de explosión por vapor podía deberse a una eliminación preferente de unidades siringilo durante tiempos cortos de autohidrólisis. De igual forma, Ibarra et al. (2007) observaron una reducción de la relación S/G después de tratamientos LMS.

4.1.4 - Análisis de la capacidad de retención de agua de las muestras

Los cambios estructurares causados con el tratamiento de explosión por vapor fueron perceptibles a simple vista como se observa en la figura 4.11, en la que se muestran las astillas antes y después del tratamiento SE8.



Figura 4.11. Astillas sin pre-tratar (a) y astillas después del pre-tratamiento SE8 (b); una ampliación de la zona remarcada se muestra en (c).

Para estudiar de forma cuantitativa estos cambios en la estructura de las muestras se utilizó la capacidad de retención de agua de las astillas. Este parámetro nos da información acerca de los cambios en la estructura interna del material y en la superficie específica de las fibras (Kokta y Ahmed, 1998). Como se observa en la figura 4.12, el tratamiento de explosión por vapor causa un aumento importante en la capacidad de retención de agua de las astillas, mayor cuanto más severo es el tratamiento (Kokta y Ahmed, 1998). Este hecho sugiere que la accesibilidad de las astillas tratadas aumenta, lo que mejorará la difusión de los reactivos químicos o de las enzimas que se apliquen en un tratamiento posterior (Ahvazi et al., 2007; Glasser y Wright, 1998). La variable que más influyó en la capacidad de retención de agua fue la adición de un segundo ciclo de explosión por vapor (incremento de 143% en SE4 a 272% en SE8), seguida de la duración del primer ciclo (aumento de 105% en SE2 a 143% en SE4). La adición de una pre-extracción con agua a 25°C antes del tratamiento de explosión por vapor también aumenta la capacidad de retención de agua, efecto relacionado con el aumento de la intensidad del tratamiento que se observó también a partir de los análisis químicos. Este efecto estaría relacionado con la mayor homogeneidad de impregnación de las muestras y el aumento en el contenido en agua.

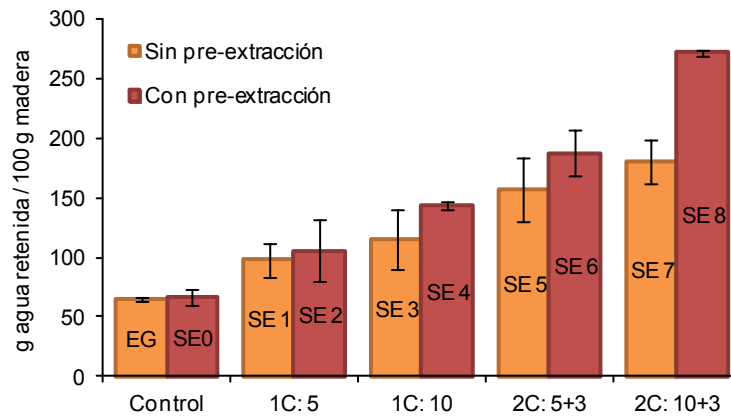


Figura 4.12. Comparación de la capacidad de retención de agua de las astillas originales y las astillas después de los tratamientos de explosión por vapor.

4.1.5 - Cambios de la porosidad relativa y área superficial

Para estudiar en mayor profundidad los cambios estructurales causados por el tratamiento de explosión por vapor, se llevó a cabo un análisis de la porosidad y del área superficial de las muestras mediante porosimetría de intrusión de mercurio (MIP), considerando un modelo de poros cilíndricos.

Los resultados del volumen relativo de poros mostraron una banda heterogénea para un diámetro de poro entre 10 y 100 μm que puede corresponder al lumen y a los vasos de las células de la madera. Este volumen no se modificó de manera importante tras los tratamientos de explosión por vapor. Por ello, el estudio se centró en el volumen de poros con un diámetro comprendido entre 10 y 10000 nm (Figura 4.13).

Las astillas de *E. globulus* sin ningún tratamiento (EG) mostraron una banda principal de volumen de poro para diámetros comprendidos entre 10 y 200 nm, y una banda más pequeña entre 3000 y 4000 nm. Después de un tratamiento de explosión por vapor de 1 ciclo de 5 minutos (SE1), la banda principal se desplazó hacia diámetros de poro mayores. Al someter las astillas a un tratamiento de 10 minutos (SE3), el volumen de poro aumentó respecto a EG y SE1, apareciendo dos picos para diámetro de poro entorno a 400 y 1500 nm, seguidos de un tercer pico para poros de 10000 nm. Al añadir un segundo ciclo (figura 4.13b), se generaron poros de diámetro entre 4000-6000 nm, siendo mayor el volumen de poros para tratamientos más largos (SE7 vs SE5).

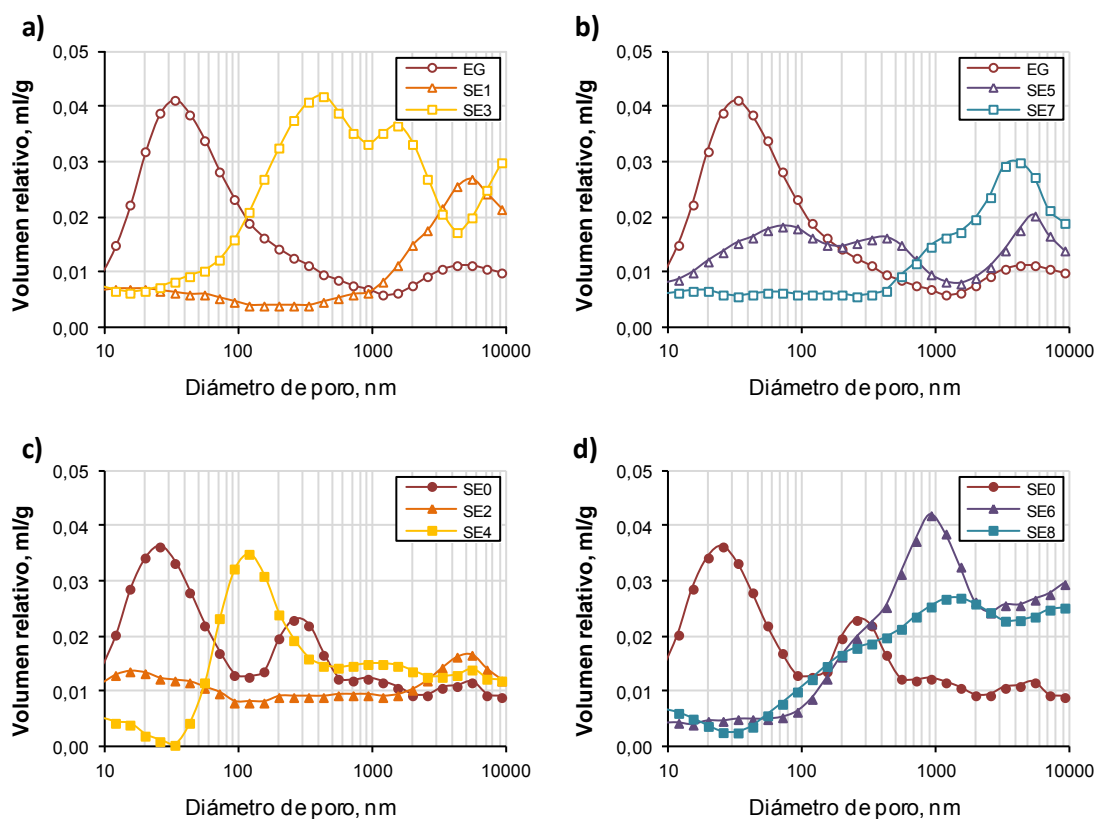


Figura 4.13. Volumen relativo de poros en las astillas tras el tratamiento de explosión por vapor: a) sin pre-extracción y con 1 ciclo, b) sin pre-extracción y con 2 ciclos, c) con pre-extracción y con 1 ciclo d) con pre-extracción y con 2 ciclos.

En la figura 4.13c y d, se muestra el volumen de poros para muestras sometidas a una pre-extracción en agua a 25°C previa al tratamiento con vapor. Comparando la muestra original (EG) con la muestra tras la pre-extracción (SE0), se observó la aparición de una nueva banda para diámetros de poro en torno a 300 nm. Estos nuevos poros pueden haberse generado debido a la extracción de compuestos de la madera solubles en agua (Romero et al., 1992). Al someter esta muestra pre-extraída a los consecutivos tratamientos de explosión por vapor, se observó un efecto mayor que el encontrado para muestras sin pre-extraer. Estos resultados parecen indicar que los nuevos poros generados durante la pre-extracción, permiten la penetración de mayor cantidad de vapor en las astillas, aumentando el efecto tanto de la autohidrólisis como de la explosión, como se observó también a partir de los datos de composición química y de capacidad de retención de agua.

Estos resultados revelan una redistribución de la red de poros en las muestras tratadas, disminuyendo el volumen de poros pequeños y aumentando el volumen de

poros grandes, pero sin prácticamente aumentar el volumen total de poros. Es decir, debido al tratamiento de explosión por vapor varios poros pequeños darían lugar a un poro de mayor tamaño. Así, en la figura 4.14 observamos cómo mientras el volumen de mesoporos (diámetro de poro entre 7 y 50 nm) disminuyó, el volumen de macroporos (entre 50 y 10000 nm) aumentó en todas las muestras tratadas, especialmente en las pre-extraídas con agua, excepto después del tratamiento menos severo (SE1 y SE2). A partir de estos resultados podría concluirse que el tratamiento de explosión por vapor tiene un efecto positivo en la formación de poros de mayor tamaño aumentando de esta forma la accesibilidad de las astillas que permitirá una mejor y más rápida penetración tanto de reactivos químicos como de enzimas.

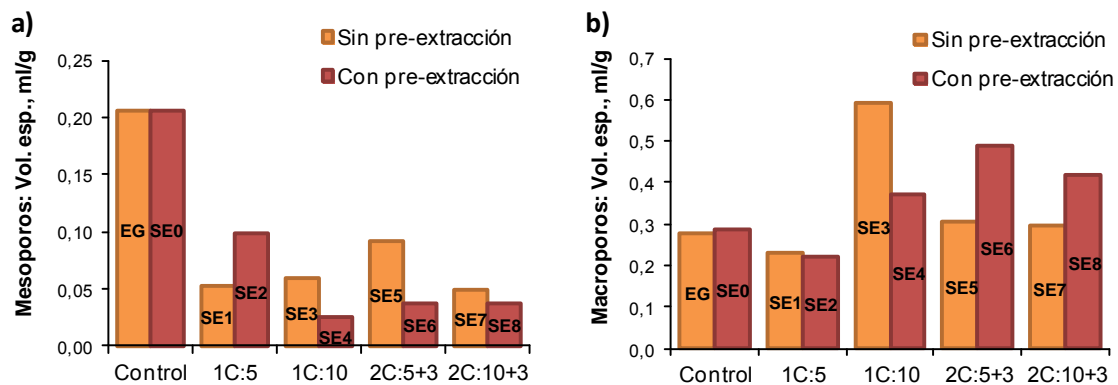


Figura 4.14. Volumen específico de a) mesoporos y b) macroporos en las astillas después de los tratamientos de explosión por vapor, comparado con las astillas antes del tratamiento (control).

El área superficial del material es también un parámetro importante que puede influir en la cinética de las reacciones tanto de las enzimas como de los reactivos químicos con la madera. En la figura 4.15 se muestra la superficie relativa de las astillas tratadas y sin tratar, observando una disminución importante de la superficie después del tratamiento de explosión por vapor para poros de diámetro entre 10 y 100 nm. Esta disminución de superficie se debe a la desaparición de poros de tamaño pequeño. La formación de macroporos dio lugar a un aumento en la superficie relativa entorno a 100 – 1000 nm. Sin embargo, debido a que los poros de tamaño grande proporcionan un área superficial pequeño, no se observó un aumento significativo en la superficie relativa para diámetros superiores a 1000 nm. Por ello, se produjo una disminución global del área superficial de las astillas tratadas, ya que la formación de poros grandes a partir de poros pequeños, conlleva una disminución en el área superficial.

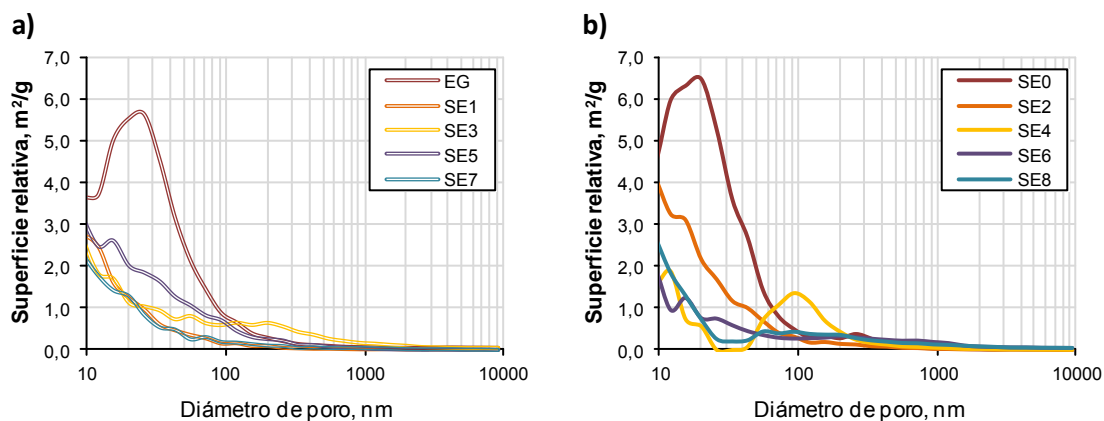


Figura 4.15. Superficie relativa de las astillas tras el tratamiento de explosión por vapor: a) sin pre-extracción, b) con pre-extracción.

En resumen, tras el tratamiento de explosión por vapor aumentó el volumen de poros de mayor tamaño y disminuyó el volumen de mesoporos, aumentando la accesibilidad pero disminuyendo el área superficial del material. Por ello, dependiendo de la naturaleza de la reacción o del proceso al que se someta el material, el efecto del tratamiento de explosión por vapor podrá ser positivo o negativo.

4.2 - Hidrólisis de las fracciones líquida y sólida generadas en el pre-tratamiento de explosión por vapor.

En este apartado se estudia el potencial de la fracción líquida obtenida en el pre-tratamiento de explosión por vapor para la producción de etanol. Para ello se han evaluado los azúcares fermentables que pueden obtenerse a partir de dicha fracción por medio de hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. Además se ha estudiado la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas, planteando la producción de etanol a partir de la fracción celulósica como alternativa al pasteado. Se ha analizado también el efecto detoxificante de un tratamiento LMS antes de la hidrólisis de la fracción sólida (Publicación III).

En la figura 4.16 se muestran las partes del proceso de biorrefinería forestal en las que se centra este apartado. La línea de pasteado se ha sustituido por la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas para la producción de bioetanol.

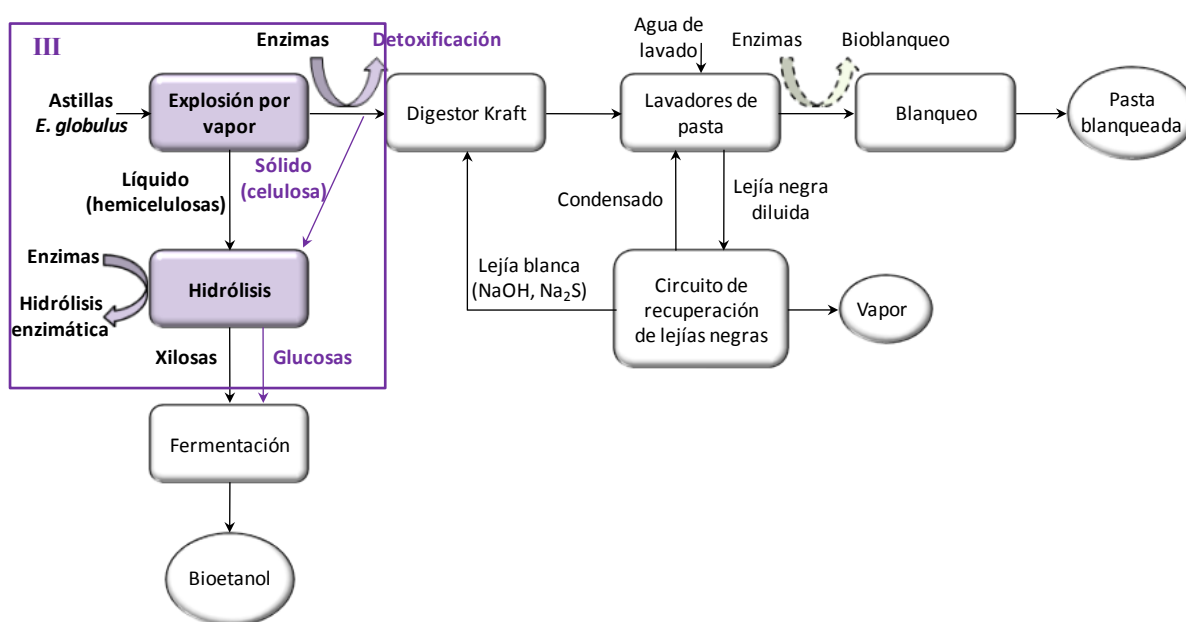


Figura 4.16. Esquema del proceso de biorrefinería forestal estudiado, indicando las partes del proceso en las que se centran la publicación III.

A partir de los resultados estudiados en el apartado anterior, se seleccionó el tratamiento SE8, que consiste en una pre-extracción en agua a 25°C seguida de dos ciclos de explosión por vapor de 10 y 3 minutos a 183°C, como el pre-tratamiento más adecuado. Esta selección se basó tanto en datos estructurales como de composición química. Así, el tratamiento SE8 fue el que permitió una mayor extracción de xilanos,

sin llegar a degradar significativamente la celulosa, permitiendo de este modo aprovechar la corriente líquida rica en hemicelulosas para obtener etanol (Li et al., 2010; Ragauskas et al., 2006; Van Heiningen, 2006), y aprovechar la fracción sólida para la producción de pasta de celulosa, sin reducir de manera importante sus propiedades mecánicas. Además, fue el pre-tratamiento que provocó un mayor aumento de la capacidad de retención de agua de la fracción sólida y, por tanto, será el que permitirá una mejor difusión de los reactivos facilitando el pasteado. Asimismo, también favorecerá la hidrólisis enzimática de la fracción sólida, en el caso de sustituir la producción de pasta por la producción de bioetanol a partir de la fracción celulósica, como se estudia en el apartado 4.2.2.

4.2.1 - Hidrólisis ácida y enzimática de la fracción líquida

El pre-tratamiento SE8 seleccionado consistió, como se ha indicado, en una pre-extracción en agua a 25°C seguida de dos ciclos de explosión por vapor de 10 y 3 minutos a 183°C. Por tanto, en cada ciclo se obtuvo una fracción líquida (SE8.1 y SE8.2), cuyo contenido en azúcares y grupos acetilo se muestra en la tabla 4.3. Se determinó también el porcentaje de azúcares recogidos en dicha fracción respecto al contenido potencial de azúcares en el *E. globulus* (EG). Durante el primer ciclo de explosión por vapor se recuperó, en forma de oligosacáridos, un 8,2% de la xilosa y un 4,0% de la glucosa presente en EG. Durante el segundo ciclo se recuperó un porcentaje mayor de xilooligosacáridos, pese a tratarse de un ciclo más corto (3 minutos frente a 10 minutos en el primer ciclo). Estos resultados pueden indicar que durante el primer ciclo de explosión por vapor, algunos polisacáridos se degradaron parcialmente sin llegar a solubilizarse en la fracción líquida, necesitando un tratamiento más largo, o un segundo ciclo para solubilizarse completamente. Además, debido a la descompresión llevada a cabo en el primer ciclo, se produjo una rotura física de la estructura de las astillas y las paredes de las fibras, lo que probablemente favoreció la extracción de hemicelulosas en el segundo ciclo. El porcentaje total de xilosa y xilooligosacáridos recuperados en las dos fracciones líquidas resultó más pequeño que el estimado a partir de las hemicelulosas extraídas del sólido (25,3% frente 46,6%). Como se ha comentado en el apartado 4.1.1, la razón podría ser una recolección ineficiente de las hemicelulosas extraídas, ya que parte podría haberse disuelto en el líquido que impregna las astillas después de la explosión y ser desechada junto con el agua del lavado de las astillas. Otra

razón podría ser la degradación de los xilooligosacáridos disueltos a furfural, observada para factores de severidad superiores a 3,5 (Li et al., 2005; Ramos et al., 1992). Sin embargo, en las fracciones líquidas obtenidas en este estudio no se detectó presencia de furfural ni de hidroximetil furfural (HMF), lo que indicaría un bajo porcentaje de reacciones de degradación. No obstante, como se ha indicado previamente, es posible que estos productos volátiles no se recuperen cuantitativamente en la fracción líquida y se pierdan parcialmente a la atmósfera durante la descompresión de la explosión por vapor (Emmel et al., 2003).

Tabla 4.3. Concentración de azúcares y ácido acético en las fracciones líquidas recogidas en el tratamiento de explosión por vapor SE8, y porcentaje de azúcares recuperado en dichas fracciones respecto al azúcar en la materia prima origina (EG). [A] hace referencia a los monómeros y [AO] a los oligosacáridos.

	Glucosa		Xilosa		Arabinosa		Ácido acético		% Recuperado	
	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	Glucosa	Xilosa
SE8-1	0,32	1,45	0,07	1,14	0,04	0,28	0,06	0,01	4,1	8,2
SE8-2	0,19	0,08	0,03	2,48	0,05	0,07	0,12	0,02	0,6	17,1
Total									4,7	25,3

La conversión de los oligosacáridos de las fracciones líquidas a monómeros se evaluó mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. La figura 4.17 muestra los rendimientos de conversión a glucosa y a xilosa durante la hidrólisis de las dos fracciones líquidas mediante los dos métodos de hidrólisis. Se determinó también el rendimiento total (a partir de la suma de los monómeros en las dos fracciones líquidas) de la hidrólisis enzimática y de la hidrólisis ácida.

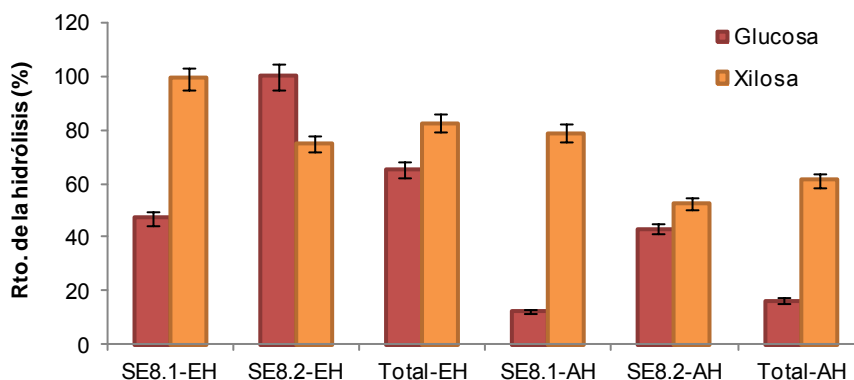


Figura 4.17. Rendimiento de la hidrólisis enzimática (EH) y la hidrólisis ácida (AH) de las fracciones líquidas obtenidas en el tratamiento de explosión por vapor SE8.

El rendimiento de conversión a xilosa mediante ambas hidrólisis fue menor en la fracción líquida obtenida durante el segundo ciclo (SE8.2). Por el contrario, la conversión a glucosa fue menor en la fracción SE8.1. Una posible explicación podría ser la diferencia en la concentración de sustrato a hidrolizar (oligosacáridos). Así, para una concentración inicial de oligosacáridos baja, se obtuvo un rendimiento alto en la hidrólisis de dichos oligosacáridos. Sin embargo, la cantidad total convertida a glucosa en la fracción SE8.1, y a xilosa en la fracción SE8.2 fue mayor que en SE8.2 y SE8.1 respectivamente. Por tanto, los rendimientos de hidrólisis más bajos podrían ser una consecuencia de una alta concentración inicial de oligosacáridos (cuyo valor es el denominador en la ecuación para determinar el rendimiento de hidrólisis).

Comparando los rendimientos totales de la hidrólisis enzimática con los de la hidrólisis ácida, se observaron mayores rendimientos para la primera (65,3% frente 16,5% para glucosa y 82,7% frente 61,4% para xilosa). Sin embargo, la hidrólisis ácida no fue optimizada, y podrían obtenerse rendimientos más altos aumentando la temperatura, el tiempo de reacción y/o la concentración de ácido. No obstante, el aumento de estas condiciones de operación podría también favorecer la degradación de los monómeros, aumentando la cantidad de inhibidores como furfural e HMF (Garrote et al., 2001; Um y van Walsum, 2009). Por otro lado, el rendimiento de la hidrólisis enzimática también podría aumentarse modificando la relación enzima-sustrato y la actividad enzimática. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática tiene la ventaja de necesitar condiciones operacionales menos severas (temperatura y pH), generando menos productos inhibidores, lo que contribuiría a una mayor producción de bioetanol (Um y van Walsum, 2010).

Sin embargo, durante el pre-tratamiento de explosión por vapor, la degradación de azúcares y lignina también puede generar productos inhibidores (Ruiz et al., 2008). Como estos inhibidores son principalmente productos solubles en agua, la fracción líquida obtenida en el pre-tratamiento probablemente contendrá una alta concentración de productos tóxicos, incluyendo fenoles (Jurado et al., 2009). Por tanto la detoxificación de esta fracción, antes o después de la hidrólisis, podría aumentar el rendimiento durante la fermentación. Con este objetivo, diferentes autores han utilizado distintos métodos de detoxificación, siendo uno de los más prometedores el tratamiento con LMS (Martin et al., 2002; Palonen y Viikari, 2004). El uso de pre-tratamientos de explosión por vapor menos severos, como los utilizados en esta tesis doctoral, podría ser

también una alternativa para reducir la generación de productos inhibidores. Finalmente, para la utilización de estas fracciones líquidas en la producción de bioetanol, es necesario el desarrollo de levaduras capaces de fermentar pentosas con alto rendimiento y de tolerar tanto altas concentraciones de etanol como pequeñas cantidades de productos inhibidores (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

4.2.2 - Hidrólisis enzimática de la fracción sólida

Como se verá en los apartados 4.3 y 4.4, la fracción sólida obtenida en el pre-tratamiento de explosión por vapor, presenta buenas características para ser utilizada en la producción de papel. Sin embargo, muchos autores han utilizado el proceso de explosión por vapor para mejorar la hidrólisis enzimática de la fracción sólida en el proceso de obtención de bioetanol (Glasser y Wright, 1998; Ohgren et al., 2006; Oliva et al., 2003; Ramos et al., 1992). Por ello, en este apartado se ha estudiado la hidrólisis enzimática de las fracciones sólidas obtenidas durante los distintos tratamientos de explosión por vapor estudiados en el apartado 4.1, planteando la producción de etanol a partir de la fracción celulósica como alternativa al pasteado.

En la figura 4.18 se muestran los rendimientos de la hidrólisis enzimática de las distintas muestras, calculados a partir de la concentración de monómeros en el líquido hidrolizado y del contenido en azúcares de la fracción sólida antes de la hidrólisis.

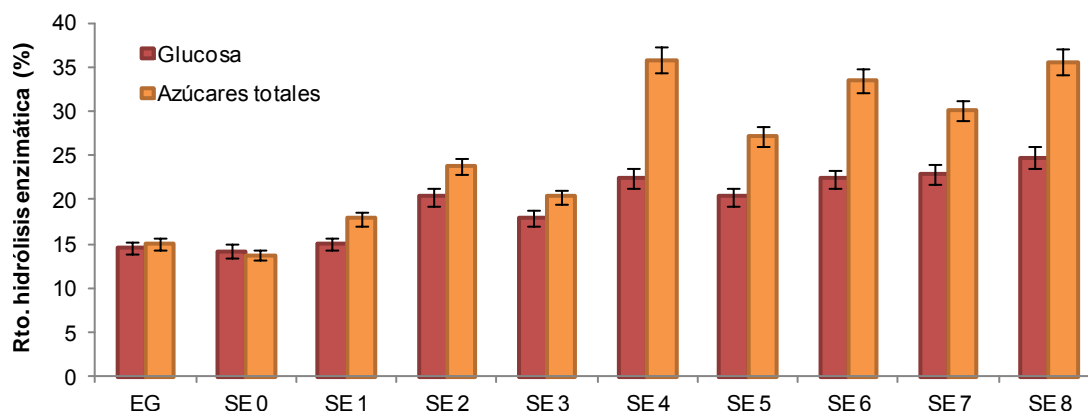


Figura 4.18. Rendimiento de la hidrólisis enzimática de la materia prima original (EG) y de las fracciones sólidas obtenidas en los distintos tratamientos de explosión por vapor.

Las muestras no sometidas a explosión por vapor (EG y SE0) mostraron rendimientos similares de hidrólisis de glucosa y de azúcares totales. Sin embargo, en

las muestras sometidas a explosión por vapor, se observó un aumento en el rendimiento de hidrólisis de azúcares totales respecto al rendimiento de glucosa, debido a la hidrólisis enzimática de los xilanos. Además, al aumentar la severidad del pre-tratamiento de explosión por vapor, aumentaron los rendimientos de hidrólisis, coincidiendo con lo observado por otros autores (Ballesteros et al., 2006; Donaldson et al., 1988; Yang y Wyman, 2004). Estos autores atribuyeron el aumento de rendimiento al aumento de la porosidad y a la eliminación de hemicelulosas, que aumenta la accesibilidad a la celulosa.

Los rendimientos de hidrólisis más altos se observaron en las muestras sometidas a los pre-tratamientos más largos después de una pre-extracción con agua (SE4 y SE8, cuyos rendimientos en glucosa fueron 24,1% y 24,7%, y en azúcares totales 35,8% y 35,6% respectivamente). Otros autores han utilizado pre-tratamientos de explosión por vapor de severidad comparable, obteniendo rendimientos de hidrólisis enzimática ligeramente superiores. Así por ejemplo, Varga et al. (2004) con bagazo de maíz (explosión por vapor a 190°C y 5 minutos, factor de severidad 3,35), Ruiz et al. (2008) con tallos de girasol (180-190°C, 5 min, factor de severidad 3,35-3,64) y Jurado et al. (2009) con paja de trigo (190°C, 10 min, factor de severidad 3,65) obtuvieron rendimientos de glucosa del 31%, 32% y 35% respectivamente. Sin embargo estos autores utilizaron materias primas no madereras, que tienen una estructura más porosa y accesible (Alaejos et al., 2004) que puede mejorar el tratamiento enzimático. Para el caso del eucalipto, se han publicado rendimientos de hidrólisis más altos, pero utilizando pre-tratamientos de explosión por vapor con factores de severidad más elevados o añadiendo un catalizador ácido (Emmel et al., 2003; Ramos et al., 1992). Sin embargo si la severidad o acidez del pre-tratamiento se aumenta demasiado, se producirá una degradación excesiva de polisacáridos que dará lugar a una menor recuperación de glucosa y a mayor presencia de inhibidores tanto en la fracción líquida como en la sólida (Ramos et al., 1992; Ruiz et al., 2008; Wu et al., 1999).

El pre-tratamiento más eficaz para mejorar la hidrólisis enzimática de la fracción sólida se seleccionó considerando el rendimiento en glucosa y no en azúcares totales, ya que se debe tener en cuenta la dificultad de encontrar microorganismos capaces de fermentar a la vez celulosa y xilosa con altos rendimientos (Duff y Murray, 1996; Tomás-Pejó, 2010). Así, el tratamiento SE8 fue el más eficaz, proporcionando un rendimiento global de glucosa y de azúcares totales respecto a la materia original (EG)

de 23,7% y 30,2% respectivamente. Sin embargo, el rendimiento real fue mayor que estos valores, ya que se deben considerar también los azúcares recogidos en la fracción líquida, como se verá en el apartado 4.2.3.

♦ **Detoxificación de la fracción sólida**

Como se ha indicado anteriormente, durante el pre-tratamiento de explosión por vapor se pueden generar inhibidores que disminuyen el rendimiento tanto de la hidrólisis enzimática como de la fermentación. Aunque la mayoría de estos compuestos son solubles en agua, muchos de ellos pueden quedar embebidos en la fracción sólida. Por ello, los tratamientos de detoxificación se aplican también a la fracción celulósica, siendo uno de los más prometedores el tratamiento con LMS (Jurado et al., 2009). Por otro lado, las xilanasas han demostrado impulsar el efecto de la lacasa, cuando se aplican en un tratamiento en serie, en aplicaciones como el blanqueo de pastas Kraft (Valls y Roncero, 2009). Por ello, en este apartado se ha estudiado el efecto de un tratamiento LMS (L), un tratamiento con xilanasas (X) y la combinación de ambos (XL) en la detoxificación de la fracción sólida antes de la hidrólisis enzimática. Dicho efecto se evaluó en función del aumento del rendimiento de hidrólisis enzimática de la fracción sólida SE8.

Como se observa en la figura 4.19, el rendimiento de hidrólisis de glucosa aumentó al aplicar un tratamiento LMS (27,1% frente a 24,7% para SE8), aunque el rendimiento de azúcares totales fue ligeramente inferior. Otros autores han observado también un aumento del rendimiento de hidrólisis después de un tratamiento con lacasa o con hongos de pudrición blanca (Dias et al., 2010; Wan y Li, 2010). Este aumento puede ser resultado de la modificación de la lignina por parte de la lacasa, que probablemente disminuye la hidrofobicidad de la lignina y cambia las características de la polaridad de la superficie, disminuyendo las uniones irreversibles entre la lignina y las celulasas durante la subsecuente hidrólisis enzimática (Palonen y Viikari, 2004). Sin embargo, Jurado et al. (2009) no observaron efecto del tratamiento LMS en el rendimiento de la hidrólisis, aunque sí encontraron un aumento en la producción de etanol durante la fermentación consecutiva, debido a la eliminación de productos inhibidores (compuestos fenólicos) durante el tratamiento LMS.

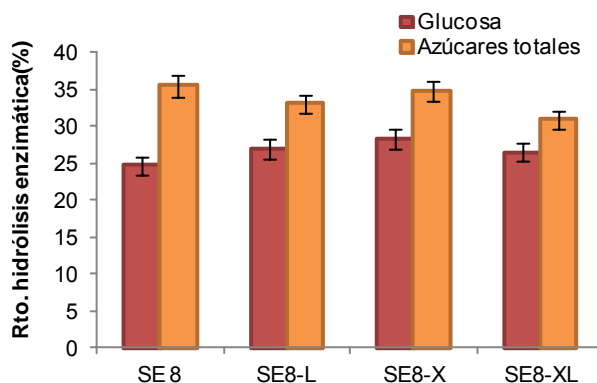


Figura 4.19. Rendimiento de la hidrólisis enzimática de la fracción sólidas SE8 tras un tratamiento enzimático con lacasa (L), xilanasa (X) o en serie xilanasa + lacasa (XL).

El tratamiento con xilanasas también aumentó el rendimiento de hidrólisis de glucosa (28,3%), aunque este tratamiento no mejoró el efecto del LMS, como se esperaba. Sin embargo, la falta de mejora en la hidrólisis enzimática no significa que dichos tratamientos no mejoren el proceso de fermentación, como mostraron los resultados de Jurado et al. (2009). Por lo tanto, se debería llevar a cabo un proceso de fermentación para estudiar con más detenimiento el efecto del tratamiento LMS y del tratamiento xilanasa – LMS en la producción de bioetanol.

Por otro lado, el efecto beneficioso del tratamiento con xilanasa en el rendimiento de hidrólisis de glucosa pudo deberse a un aumento de la accesibilidad del material debido a la eliminación de xilanos, como se observó después de tratamientos de explosión por vapor y otros métodos de extracción de hemicelulosas. No obstante, el rendimiento global de glucosa del proceso, teniendo en cuenta el pre-tratamiento de explosión por vapor y el tratamiento con xilanasas, fue mayor que el observado para la muestra SE8 y la muestra SE8-L (27,8% frente 23,7% y 26,7% respectivamente).

4.2.3 - Rendimiento global del proceso de hidrólisis enzimática

Para optimizar el proceso global de obtención de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática de ambas fracciones, se deben tener en cuenta diferentes factores. El primero es la recuperación de celulosa en la fracción sólida y de hemicelulosa en la fracción líquida durante el pre-tratamiento de explosión por vapor. La cantidad de inhibidores generados durante dicho pre-tratamiento y el rendimiento de hidrólisis tanto de la fracción sólida como de la fracción líquida son también factores a

tener en cuenta (Ruiz et al., 2008). Por tanto, se ha determinado el rendimiento global del proceso teniendo en cuenta todas estas consideraciones.

Multiplicando el rendimiento de recuperación de xilooligosacáridos en la fracción líquida (25,3% del xilano de la materia prima original EG) por el rendimiento de la hidrólisis enzimática de la fracción líquida (82,7%), se determinó el rendimiento de la hidrólisis de la fracción líquida respecto al contenido en xilanos de EG (21,0%). Teniendo en cuenta también la hidrólisis de la fracción sólida (34.5%), el rendimiento global de xilosa fue un 55,5% de las hemicelulosas presentes en la materia prima original (8,6% del peso total de EG). Sin embargo, este rendimiento podría incrementarse optimizando la recolección de hemicelulosas en la fracción líquida, ya que aproximadamente un 20% de las hemicelulosas de la materia prima original se perdió durante el proceso. Por otra parte, el rendimiento global de glucosa, incluyendo la hidrólisis enzimática de ambas fracciones, fue un 26,8% de la glucosa presente en EG (12,3% del peso total de la materia prima). Por tanto, a partir de 100 g de *E. globulus* se obtuvieron 21g de azúcares, pudiéndose incrementar este rendimiento introduciendo algunas modificaciones en el proceso, como la detoxificación con LMS de ambas fracciones y la optimización de la recuperación de hemicelulosas en la fracción líquida, como ya se ha mencionado. No obstante, rendimientos globales similares (22%) fueron encontrados por otros autores (Ruiz et al., 2008) usando tallos de girasol y un pre-tratamiento de explosión por vapor más severo, que podría producir más inhibidores además de aumentar los costes operacionales del proceso.

4.3 - Efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el pasteado Kraft y en el bioblanqueo

En este apartado se recoge el estudio del efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en la línea de producción de pastas de celulosa, ya que la introducción de una pre-extracción de hemicelulosas en el proceso puede influir de manera importante tanto en el proceso de pasteado (Publicación IV) como en el de blanqueo (Publicación V). Se ha estudiado un sistema de blanqueo biológico, incluyendo una primera etapa con sistema LMS, que contribuirá a disminuir el consumo de reactivos de blanqueo y a mejorar las propiedades de la pasta obtenida.

En la figura 4.20 se indica en qué partes del proceso de biorrefinería forestal se centra este apartado.

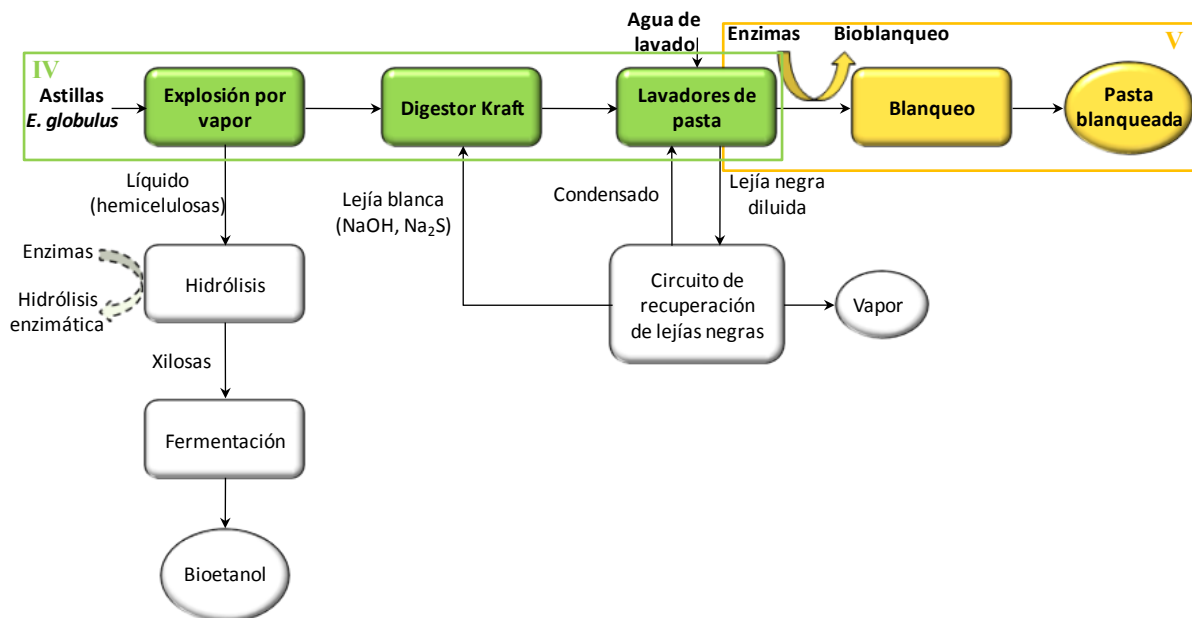


Figura 4.20. Esquema del proceso de biorrefinería forestal estudiado, indicando las partes del proceso en las que se centran las publicaciones IV y V.

Como se ha mencionado en el apartado 4.2, el pre-tratamiento seleccionado como el más adecuado para un pasteado consecutivo fue el SE8, tanto por el aumento de accesibilidad de la fracción sólida como por la cantidad de hemicelulosas extraídas en la fracción líquida.

En este apartado se ha llevado a cabo el pasteado Kraft de astillas sin pre-tratar y de astillas pre-tratadas SE8, comparando los resultados obtenidos en cuanto a

rendimiento del proceso, consumo de reactivos y calidad de las pastas obtenidas. Posteriormente, la pasta obtenida a partir de astillas sin pre-tratar se sometió a una etapa de deslignificación con oxígeno. El objetivo fue obtener una pasta con un contenido en lignina más próximo al de la pasta pre-tratada, y poder comparar tanto la refinabilidad y las propiedades mecánicas de las hojas formadas, como la blanqueabilidad de las pastas. Además, se utilizó una pasta Kraft industrial, donada por La Montañanesa S.A., para comparar ambos parámetros.

4.3.1 - Efecto del pre-tratamiento en el pasteado Kraft

Para estudiar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el proceso Kraft, se pastearon astillas pre-tratadas (SE) y astillas sin pre-tratar (Control). Las condiciones del pasteado fueron las mismas para ambos tipos de astillas (publicación IV), variando el tiempo de cocción entre 24 y 56 minutos (correspondientes a un factor H de 180 a 400).

El efecto principal del pre-tratamiento fue una gran reducción del número kappa de las pastas obtenidas en todas las condiciones ensayadas (figura 4.21). La mayor reducción, comparando pastas con y sin pre-tratamiento, se observó bajo las condiciones de pasteado más suaves (factor H de 180), obteniendo una pasta con un número kappa un 70% menor que la pasta control obtenida en las mismas condiciones de pasteado (número kappa de 16 frente a 49). Otros autores han encontrado también una reducción en el número kappa de las pastas obtenidas con distintos pre-tratamientos de extracción de hemicelulosas, aunque la mayoría de ellos observaron reducciones menores que las conseguidas en este trabajo. Así, Helmerius et al. (2010) y Schild et al. (2010) obtuvieron reducción del 40% y del 57% utilizando autohidrólisis como pre-tratamiento de abedul y eucalipto respectivamente. La mayor reducción del número kappa conseguida en esta tesis se debe probablemente a que la explosión por vapor, además de extraer hemicelulosas, proporciona un residuo sólido con una estructura más abierta que la autohidrólisis, debido al efecto de la rápida descompresión, como se estudió en el apartado 4.1. Sin embargo, San Martín et al. (1995) obtuvieron una reducción del 49% en el pasteado Kraft de *Pinus radiata* pre-tratado mediante explosión por vapor, aunque en este caso el hecho de que utilizase una madera de conífera en lugar de una madera de frondosa como el eucalipto, con mayor contenido en xilanos y grupos acetilo, pudo ser el factor clave.

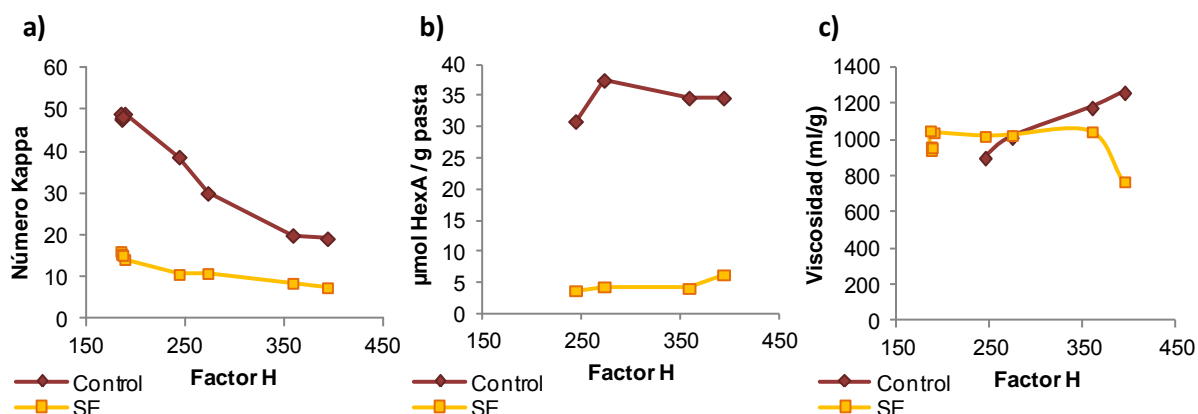


Figura 4.21. Número kappa (a), contenido en ácidos hexenurónicos (b) y viscosidad (c) de una pasta Kraft obtenida a partir de una muestra control (sin pre-tratamiento) y de una muestra pre-tratada mediante explosión de vapor (SE).

Otro efecto importante del pre-tratamiento, fue la disminución del contenido en ácidos hexenurónicos de las pastas obtenidas (figura 4.21b). Teniendo en cuenta la solubilización de hemicelulosas durante el tratamiento de explosión por vapor y que los ácidos hexenurónicos se forman durante el pasteado Kraft a partir de los ácidos glucurónicos presentes en los xilanos, dicho pre-tratamiento prevendrá de la formación de dichos ácidos hexenurónicos. Reducciones similares fueron encontradas por otros autores mediante autohidrólisis y algo menores, pero también significativas, mediante pre-tratamientos de extracción alcalina (Mendes et al., 2009; Schild et al., 2010). La reducción del contenido en ácidos hexenurónicos es importante, ya que estos compuestos consumen reactivos durante las secuencias de blanqueo (Ragnar, 2001; Vuorinen et al., 1999) y aceleran el amarilleamiento del papel.

Respecto a la viscosidad de las pastas obtenidas (figura 4.21c), se obtuvieron valores similares a los de pastas comerciales para la mayoría de las muestras. Sin embargo, la viscosidad de las pastas con pre-tratamiento cayó bruscamente a partir de un factor H mayor de 360, debido a la degradación de la celulosa provocada por un pasteado demasiado largo (causando también una disminución del rendimiento de pasteado, figura 4.23). Para un factor H de 270, se obtuvo el mismo valor de viscosidad en la pasta pre-tratada y en la control, aunque el número kappa fue mucho menor en la primera (11,2 frente 30,4). Por tanto, la adición de un pre-tratamiento de explosión por vapor permitió una deslignificación elevada, sin degradar las cadenas de celulosa. De hecho, algunos autores han reportado un pequeño aumento de la viscosidad en pastas pre-tratadas mediante autohidrólisis, debido a la eliminación de polisacáridos de bajo

peso molecular (Mendes et al., 2009). En la figura 4.22b se muestran las fibras de la pasta pre-tratada, no observándose rotura ni degradación de las mismas.

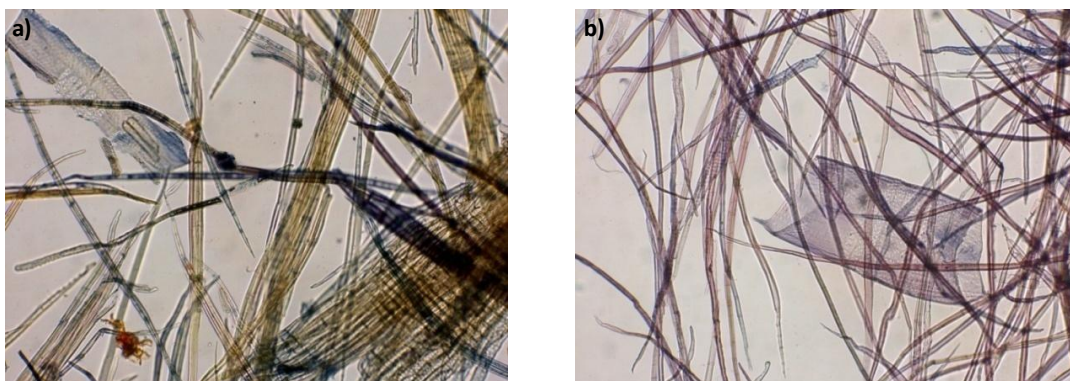


Figura 4.22. Imágenes tomadas con microscopio óptico de la pasta Kraft obtenida a partir de una muestra control (sin pre-tratamiento) (a) y de una muestra pre-tratada mediante explosión de vapor (SE) (b) tras un pasteado Kraft con factor H igual a 190.

La figura 4.23 muestra el rendimiento global y el rendimiento útil obtenidos para las dos muestras, sin tener en cuenta la pérdida de rendimiento durante el pre-tratamiento, es decir, considerando sólo el proceso Kraft. El rendimiento global disminuyó con el tiempo de cocción (y por tanto con el factor H) en las dos muestras estudiadas, porque al prolongar el pasteado más cantidad de lignina, y también de polisacáridos, se disolvió en la lejía de cocción. Los rendimientos global y útil de la muestra control fueron mayores que los observados para la muestra pre-tratada excepto para factores H menores de 200, valor a partir del cual el rendimiento útil de la muestra pre-tratada fue mayor que el de la muestra control. Estos resultados se deben a que tiempos de cocción tan cortos no permitieron una cocción completa de las astillas control, presentando gran cantidad de incocidos o rechazos y paquetes de fibras (figura 4.22a), y dando lugar, por tanto, a rendimientos globales altos aunque con rendimientos útiles bajos. Por el contrario, para tiempos de cocción largos, las astillas control alcanzaron un grado de pasteado adecuado, mientras que las astillas pre-tratadas, que permiten una difusión más rápida de los reactivos, fueron pasteadas en exceso, disolviéndose mayor cantidad de polisacáridos en la lejía de cocción y disminuyendo de esta forma el rendimiento del proceso, sin conseguir una caída tan importante en el contenido en lignina (figura 4.21a). Esta reducción del rendimiento en el pasteado de astillas sometidas a pre-extracción de hemicelulosas ha sido observada previamente por otros autores (Mendes et al., 2009; Vila et al., 2011). Por otro lado, probablemente debido a la mejor difusión de los reactivos en las astillas pre-extraídas, se observó una

reducción en la cantidad de incocidos en las pastas, igualándose el rendimiento global y el rendimiento útil del pasteado. Un efecto similar fue observado por Schild et al. (2010) en el pasteado alcalino de astillas pre-tratadas tanto mediante autohidrólisis como mediante pre-extracción alcalina.

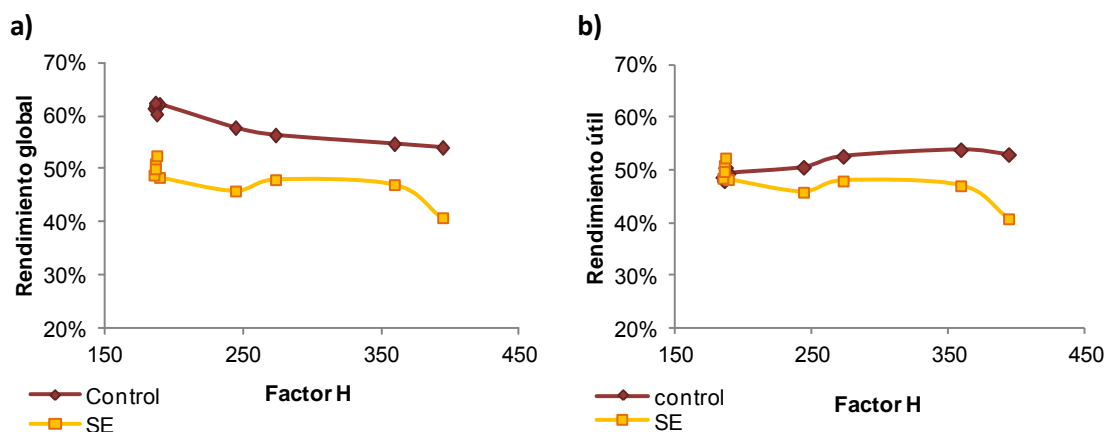


Figura 4.23. Rendimiento global (a) y útil (b) del pasteado Kraft de una muestra control (sin pre-tratamiento) y una muestra pre-tratada mediante explosión por vapor (SE).

Por otro lado, el pre-tratamiento de explosión por vapor incrementó el consumo de Na_2S y NaOH (figura 4.24) durante el pasteado, contrariamente a lo observado por San Martín et al. (1995). Sin embargo, otros autores observaron también un aumento del consumo de álcali, asociado a la degradación de polisacáridos durante el pasteado (reducción del rendimiento) (Mendes et al., 2009). Además, debe tenerse en cuenta que el mayor consumo de reactivos en las muestras pre-tratadas proporcionó pastas con mucho menor número kappa (figura 4.21a), sugiriendo una mayor eficacia en el aprovechamiento de los reactivos en la deslignificación.

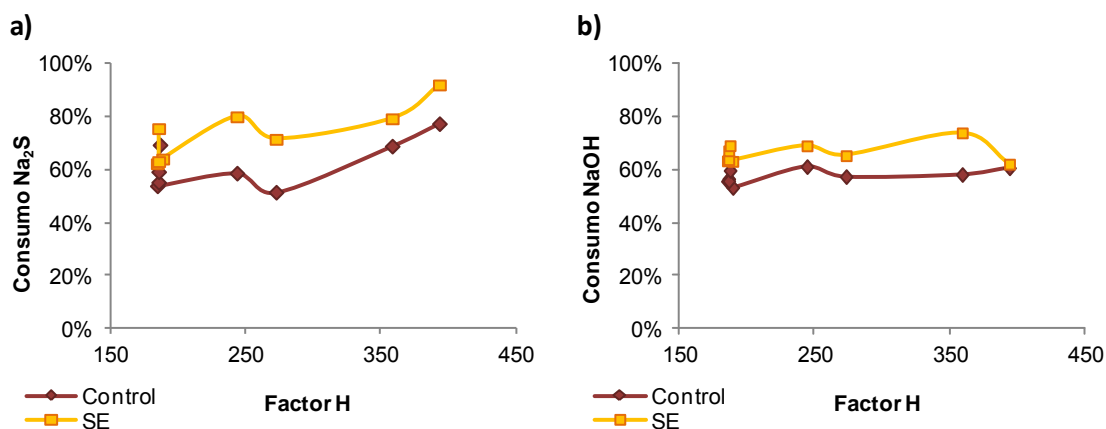


Figura 4.24. Consumo de reactivos durante el pasteado Kraft de una muestra control (sin pre-tratamiento) y una muestra pre-tratada mediante explosión por vapor (SE).

A partir de los resultados anteriores, se puede concluir que bajo las mismas condiciones de pasteado, las astillas pre-tratadas con explosión por vapor se pastean de forma más rápida y eficaz que las astillas sin tratar, o alternatively, pueden pastearse a una temperatura menor o con menor carga de álcali manteniendo las misma producción de pasta (Ahvazi et al., 2007; Al-Dajani et al., 2009; San Martin et al., 1995). Bajo condiciones similares de pasteado, el tiempo de cocción puede reducirse de 60 a 25 minutos, obteniendo una pasta de calidad similar (número kappa ~16 y viscosidad ~ 1000 ml/g) con un buen rendimiento (~50%). Incluso teniendo en cuenta la pérdida de rendimiento debida al pre-tratamiento, que reduciría el rendimiento total del proceso a ~40%, la producción de pasta podría mantenerse debido a la reducción del tiempo de pasteado. Además, gran parte de las hemicelulosas se extraerían sin apenas degradación antes del pasteado, pudiéndose utilizar para la producción de etanol u otros compuestos de valor añadido. Por otro lado, se obtendrían pastas con un contenido muy bajo en ácidos hexenurónicos, que podrían reducir el consumo de reactivos durante el proceso de blanqueo. Sin embargo, la reducción del contenido en hemicelulosas de las pastas, puede ser perjudicial en la refinabilidad de las pastas y en las propiedades mecánicas de las mismas.

◆ **Refinabilidad y propiedades de las hojas obtenidas**

Para evaluar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en la respuesta de las pastas ante el refino y en las propiedades finales de la pasta obtenida, se sometieron las pastas a refino en PFI y se formaron hojas con las pastas resultantes. Se compararon tres tipos de pasta Kraft: pasta pre-tratada (SE), pasta control obtenida en las mismas condiciones de pasteado que la pasta SE y pasta industrial (Ind.). La pasta control, fue sometida a una deslignificación con oxígeno tras el pasteado, para obtener una pasta con menor contenido en lignina, más comparable a la pasta SE en términos de refinabilidad y propiedades del papel. Así el número kappa y la viscosidad de las pastas comparadas fueron respectivamente 15,5 y 1166 ml/g para la pasta SE, 26,4 y 915 ml/g para la pasta Control+O₂ y 14,0 y 1136 ml/g para la pasta industrial.

La figura 4.25 muestra la evolución del grado de refino (medido como °Schopper-Riegler, °SR) frente a la intensidad del refino (número de revoluciones en PFI) para las tres pastas estudiadas. Se observó un aumento menor del grado de refino al aumentar el número de revoluciones del PFI en el caso de las pastas pre-tratadas. Es

decir, las pastas obtenidas a partir de astillas sometidas a explosión por vapor consumieron más energía que las pastas sin pre-tratar (control e industrial) para alcanzar un determinado °SR, probablemente debido a la eliminación de hemicelulosas durante el pre-tratamiento. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Helmerius et al., 2010; Schild et al., 2010).

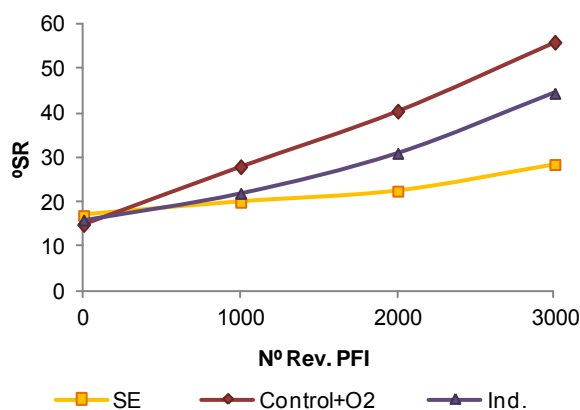


Figura 4.25. Grado de refino (°Schopper-Riegler) frente a la energía de refino (revoluciones PFI) para una pasta Kraft industrial, una pasta Kraft obtenida a partir de una muestra control (sin pre-tratamiento) y una pasta Kraft con pre-tratamiento de explosión de vapor (SE)

Las propiedades mecánicas y ópticas de las tres pastas refinadas y sin refinar se muestran en la figura 4.26. Las tres pastas sin refinar presentaron un °SR similar (17, 15 y 16 para SE, Control, Ind.) y propiedades mecánicas semejantes, excepto el índice de tracción. Este índice está relacionado con la capacidad de unión entre las fibras. Por ello, el bajo valor obtenido para la pasta pre-tratada puede deberse al bajo contenido en hemicelulosas de dicha pasta, ya que este polímero es más amorfo y tiene mayor área superficial por gramo que la celulosa, favoreciendo la unión entre fibras (Karlsson, 2006). El índice de desgarrado de la pasta pre-tratada y la pasta industrial sin refinar fue similar, lo que indica un grado similar de degradación de las fibras, de acuerdo con lo publicado por San Martín et al. (1995).

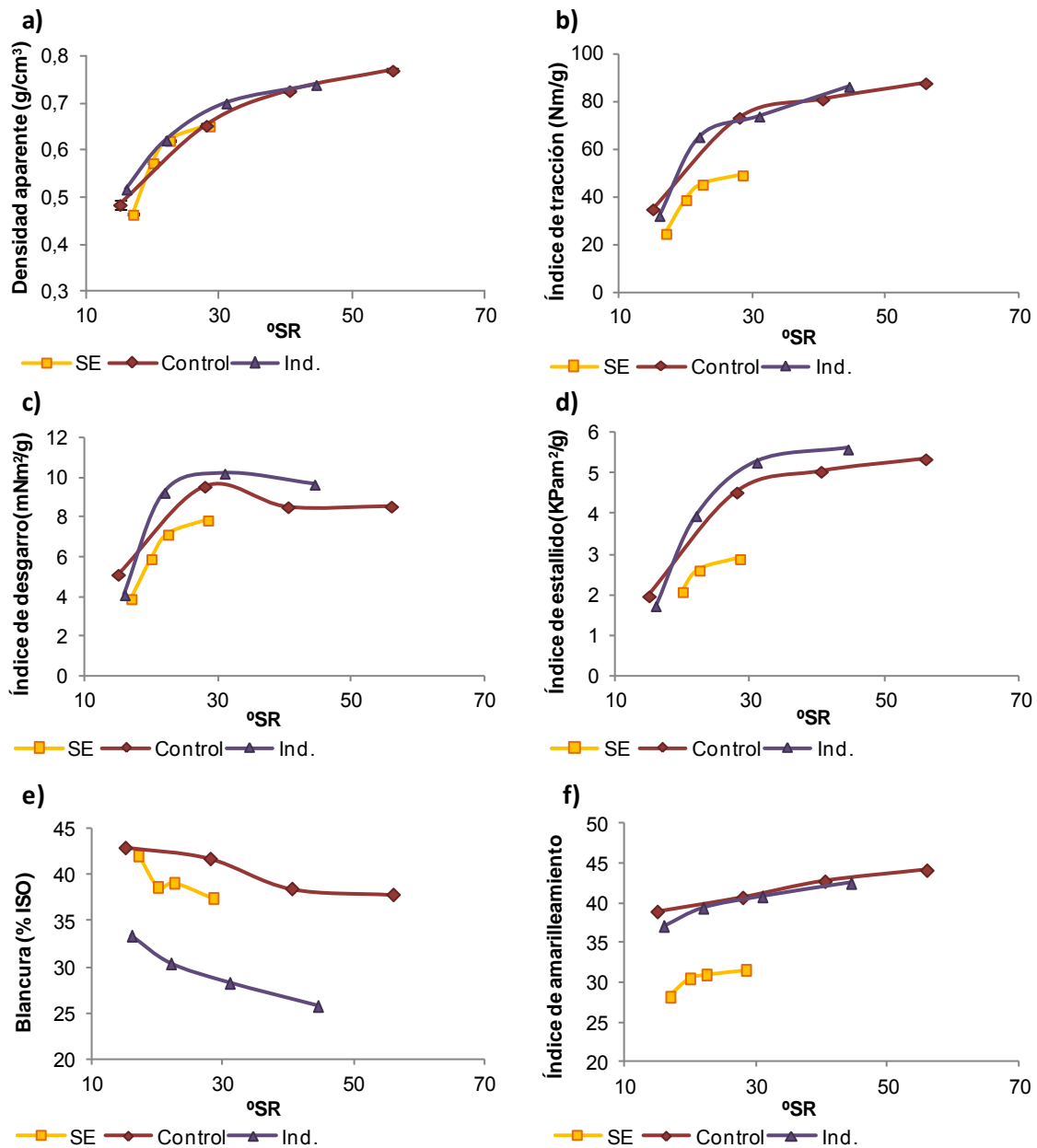


Figura 4.26. Propiedades mecánicas y ópticas de la pasta Kraft industrial (Ind.), la pasta control tras deslignificación con oxígeno (Control) y la pasta con pre-tratamiento de explosión por vapor (SE): a) densidad aparente, b) índice de tracción, c) índice de desgarrar, d) índice de estallido, e) blancura y f) índice de amarilleamiento.

A medida que aumentó el grado de refino, la densidad aparente de las tres pastas aumentó de manera análoga (figura 4.26a), indicando una cantidad de finos y un grado de fibrilación similar (Helmerius et al., 2010). Las propiedades mecánicas de las pastas también aumentaron con el refino, como se esperaba. Sin embargo la evolución fue diferente para las distintas pastas. Así, las pastas pre-tratadas (SE) mostraron menores índices de tracción y de estallido que las pastas control e industrial, debido al menor

contenido en hemicelulosas. Similares resultados fueron obtenidos por Helmerius et al. (2010), quienes observaron menores índices a medida que aumentaba la duración del pre-tratamiento de autohidrólisis. Respecto al índice de desgarró, pese a que las pastas no refinadas pre-tratada e industrial mostraron valores similares, tras el refino la pasta pre-tratada presentó valores inferiores comparada con la pasta industrial. Sin embargo, la diferencia fue menor que las observadas para los índices de tracción y estallido. Por el contrario, Helmerius et al. (2010) encontraron valores más bajos de índice de desgarró en pastas refinadas sin pre-tratar comparados con los obtenidos en pastas sometidas a pre-tratamientos de autohidrólisis o de extracción alcalina.

En cuanto a las propiedades ópticas, la pasta pre-tratada presentó las mejores características ya que mostró un índice de amarilleamiento mucho menor que el de las pastas control e industrial y una blancura mayor que la pasta industrial. A medida que aumenta el grado de refino, el amarilleamiento aumenta y la blancura disminuye, debido probablemente a la homogenización de las pastas tras la separación de pequeños paquetes de fibras microscópicos presentes en las pastas y/o a la formación de grupos cromóforos. Resultados similares para la blancura fueron obtenidos por otros autores (Helmerius et al., 2010).

Por tanto, aunque las pastas pre-tratadas mostraron propiedades mecánicas algo menores que las pastas control e industrial, las propiedades ópticas fueron mayores, y no se observó degradación significativa de las fibras. Además, la evolución de las propiedades mecánicas y ópticas tras un tratamiento de envejecimiento acelerado fue mejor para las pastas pre-tratadas (Publicación IV).

4.3.2 - Efecto del pre-tratamiento en el bioblanqueo

Las pastas sin refinar utilizadas para el estudio de la refinabilidad y de las propiedades físico-mecánicas fueron sometidas a una secuencia de blanqueo consistente en una etapa enzimática con LMS y oxígeno (LMO₂), una extracción alcalina (E) y un blanqueo final con peróxido de hidrógeno (P). La adición de la primera etapa enzimática pretende disminuir el consumo de reactivos de blanqueo y a mejorar las propiedades de las pastas. Para evaluar este efecto, se añadió una secuencia control sin adición de LMS ni oxígeno en la etapa enzimática para cada tipo de pasta (No-LMO₂). Además, para evaluar la importancia de la adición de oxígeno en la etapa enzimática, se añadió un

control para la pasta SE en el que se añadió LMS pero no oxígeno (LM-NoO₂). Más detalles sobre las condiciones del blanqueo se pueden encontrar en la publicación V.

Las características de las pastas sin blanquear utilizadas se incluyen en las figuras 4.27 – 4.31. La nomenclatura utilizada es la siguiente: *SE* corresponde a la pasta obtenida con pre-tratamiento de las astillas de explosión por vapor; *NoSE* se refiere a la pasta control obtenida mediante el mismo pasteado Kraft que SE pero sin pre-tratamiento, y sometida posteriormente a una deslignificación con oxígeno; e *Ind* corresponde a la pasta Kraft industrial proporcionada por La Montañanesa.

En la figura 4.27 se puede observar que el número kappa de la pasta SE sin blanquear fue menor que el de la pasta NoSE, es decir, un pre-tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado corto permitió alcanzar mayor grado de deslignificación que dicho pasteado corto seguido de una deslignificación con oxígeno, consiguiendo además una mayor viscosidad (1166 ml/g frente a 915 ml/g). Por otro lado, la pasta industrial sin blanquear, utilizada como referencia, mostró un número kappa ligeramente inferior que la pasta SE, sugiriendo una deslignificación similar en ambos procesos.

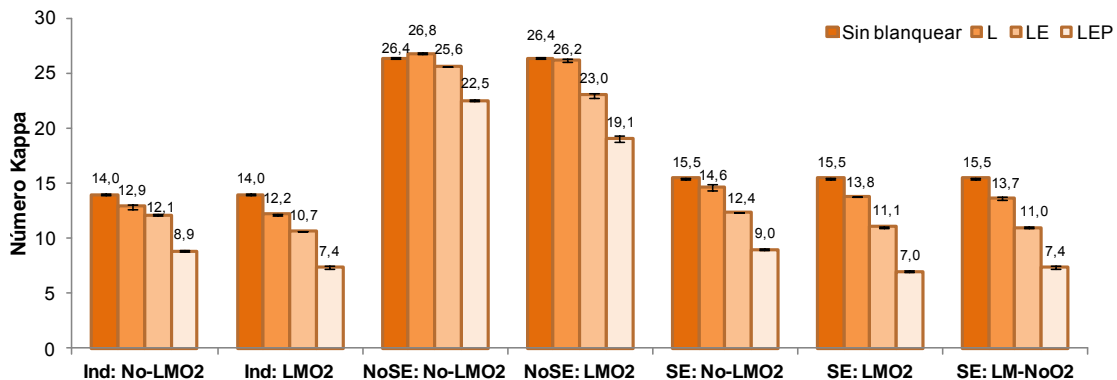


Figura 4.27. Evolución del número Kappa durante la secuencia de blanqueo para los distintos ensayos.

Cada etapa de blanqueo produjo una disminución en el número kappa, siendo más acusada cuando se añadió LMS en la primera etapa de la secuencia, coincidiendo con lo observado por otros autores (Eugenio et al., 2010a; Fillat et al., 2010; Valls et al., 2010). Así, para la pasta NoSE se obtuvo una reducción del número kappa al final de la secuencia del 27,7% cuando se añadió el LMS, (NoSE:LMO₂) frente a 14,5% para su control sin adición de LMS (NoSE:No-LMO₂). Paralelamente, para la pasta industrial se

consiguió una reducción del 47,0% (Ind:LMO₂) frente a 36,6% para su control sin LMS (Ind:No-LMO₂). Otros autores han obtenido mayores reducciones del número kappa durante el bioblanqueo de pastas Kraft, pero utilizando más etapas en la secuencia TCF, con etapas enzimáticas o de peróxido de hidrógeno más largas y/o con mayor concentración de reactivos (Moldes et al., 2010).

Otra forma de aumentar deslignificación, podría ser la adición de un pre-tratamiento de explosión por vapor antes del pasteado Kraft, como se observa en la figura 4.21. Tanto la secuencia con adición de enzimas como la secuencia control proporcionó mayores reducciones en el número kappa de la pasta pre-tratada (54,5% para SE:LMO₂ y 41,7% para SE:No-LMO₂) que en las pastas sin pre-tratamiento (NoSE e Ind). Estos resultados sugieren que un pre-tratamiento de explosión por vapor antes del pasteado Kraft puede mejorar cualquier secuencia de blanqueo, corroborando los resultados obtenidos por otros autores. Así, Josefsson et al. (2002) observaron una mayor reducción del contenido en lignina en pastas blanqueadas químicamente cuanto más severo fue el pre-tratamiento de explosión por vapor. Vila et al. (2011) también señalaron que al menos parte de la lignina se modificó durante el tratamiento de autohidrólisis haciéndola más susceptible a la deslignificación con oxígeno o en consecutivas etapas de blanqueo.

Cuando se llevó a cabo una secuencia de blanqueo similar a aquella que proporcionó mejores resultados (SE:LMO₂), pero sin la adición de oxígeno en la etapa enzimática (SE:LM-NoO₂), se consiguió una reducción del número kappa ligeramente menor (52,3% vs 54,5%). Este resultado sugiere que la presión de oxígeno no es un factor muy influyente en la deslignificación, y aunque generalmente se considera necesaria para mejorar el tratamiento LMS, su eficacia depende del tipo de pasta, del tipo de lacasa y de las condiciones del tratamiento. Resultados similares fueron encontrados por otros autores (Eugenio et al., 2010b),

Durante la secuencia de blanqueo, la viscosidad de las pastas se redujo aproximadamente 100 ml/g en todas las muestras, excepto NoSE:LMO₂ en la que la reducción fue de 200 ml/g. Así, al final de la secuencia de blanqueo se observó una viscosidad de 1040 y 1050 ml/g para la pasta industrial y la pasta pre-tratada SE respectivamente. Estos resultados coinciden con los señalados por Oudia et al. (2008), quienes demostraron que mediante secuencias de bioblanqueo se puede alcanzar una

alta deslignificación sin reducir de manera importante la viscosidad de las pastas. Más detalles sobre la viscosidad se muestran en la publicación V.

La figura 4.28 muestra la evolución de la blancura durante las distintas etapas del blanqueo. La pasta SE y la pasta NoSE sin blanquear presentaron una blancura muy similar, pese al mayor contenido en lignina de la segunda, probablemente debido a la eliminación de grupos cromóforos durante la deslignificación con oxígeno. Sin embargo, la pasta industrial sin blanquear presentó una blancura menor, posiblemente como resultado de un pasteado Kraft más largo.

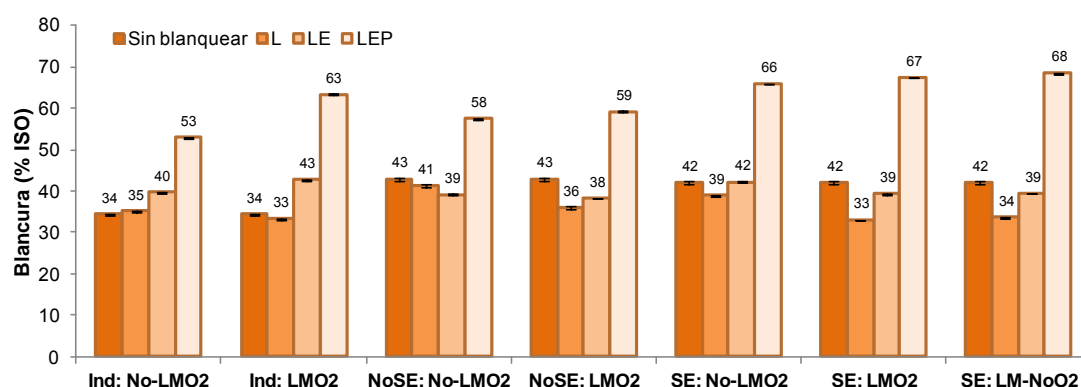


Figura 4.28. Evolución de la blancura durante la secuencia de blanqueo para los distintos ensayos.

El mayor aumento de blancura tuvo lugar durante la etapa de peróxido de hidrógeno, como se esperaba. En la etapa enzimática, la blancura se redujo, debido a la formación de grupos cromóforos durante la oxidación de la lignina por el sistema lacasa – mediador (Fillat et al., 2010). Sin embargo, al final de la secuencia LEP, el efecto del LMS se invirtió, obteniéndose blancuras más altas cuando el sistema LMS fue usado en la primera etapa del blanqueo. Por tanto, el tratamiento LMS aumentó la eficacia de las etapas consecutivas en la secuencia de blanqueo, como han observado otros autores (Moldes et al., 2010; Vivekanand et al., 2008).

Si se comparan las blancuras finales obtenidas con pastas pre-tratadas (SE) y con pastas sin pre-tratamiento (NoSE), resulta evidente que el pre-tratamiento de explosión por vapor favorece el aumento de blancura durante el proceso de blanqueo, obteniendo aumentos del 25,2% para SE:LMO₂ frente a 16,3% para NoSE:LMO₂. La pasta industrial bioblanqueada (Ind:LMO₂) mostró también una blancura final inferior a la pasta SE, aunque superior a la pasta NoSE. Por tanto, al igual que se observó en el

estudio del número kappa, la adición de un pre-tratamiento de explosión por vapor previo al pasteado Kraft mejoró el proceso de blanqueo. Mejoras en la blancura tras el blanqueo fueron observadas también por otros autores cuando se llevó a cabo un pre-tratamiento de autohidrólisis (Vila et al., 2011).

La secuencia sin adición de oxígeno en la etapa enzimática (SE:LM-NoO₂), proporcionó una pasta final con una blancura ligeramente superior a la secuencia con adición de oxígeno (SE:LMO₂). Teniendo en cuenta que la primera proporcionó pastas con un número kappa ligeramente mayor, y que ni las diferencias observadas en el número kappa ni en la blancura fueron muy grandes, se puede concluir que la adición de oxígeno en la etapa enzimática no es un parámetro influyente en el blanqueo en las condiciones ensayadas.

La figura 4.29 muestra el índice de amarilleamiento de las pastas después de cada etapa del blanqueo. Este índice se utiliza para estudiar la degradación del color blanco. Es decir, el amarilleamiento del papel debido al envejecimiento (por exposición a la luz y/o a altas temperaturas y humedad) se puede medir a través de los cambios en el índice de amarilleamiento.

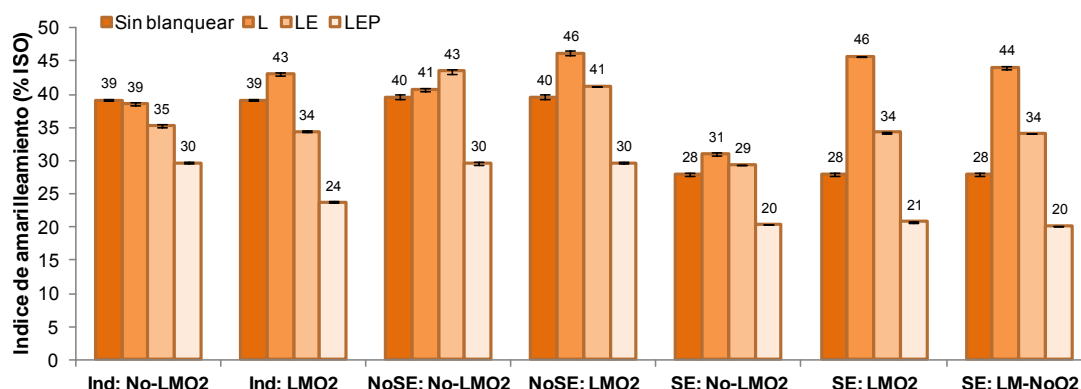


Figura 4.29. Evolución del amarilleamiento durante la secuencia de blanqueo para los distintos ensayos.

Comparando las pastas sin blanquear, se observó menor índice de amarilleamiento en las pastas pre-tratadas (SE) que en las pastas sin pre-tratamiento (NoSE e Ind). Durante la secuencia de blanqueo LEP, se encontró un aumento del índice de amarilleamiento después del tratamiento enzimático (L), siendo más pronunciado en la presencia de LMS, e incluso mayor en las pastas pre-tratadas. Este efecto puede deberse a la generación de compuestos que aportan color a la pasta durante

la etapa enzimática. El aumento fue más pronunciado en la pasta SE debido a que el efecto de las enzimas se acentúa en este tipo de pasta, como se ha visto anteriormente. Tras la etapa de extracción alcalina (E), el índice de amarilleamiento disminuyó hasta valores más próximos a los de la pasta sin blanquear, probablemente debido a la solubilización de los compuestos coloreados generados en la etapa anterior. Sin embargo, es en la etapa final con peróxido de hidrógeno, donde se observaron las mayores reducciones en el índice de amarilleamiento. Teniendo en cuenta la secuencia completa, se obtuvo una reducción entre 7 y 15 unidades en las pastas blanqueadas, respecto a las pastas sin blanquear. El menor índice de amarilleamiento se observó en las pastas blanqueadas pre-tratadas, sugiriendo que el pre-tratamiento de explosión por vapor contribuye a la obtención de pastas con menor color, y por tanto más próximas al blanco ideal.

Para estudiar en mayor detalle el color de las pastas obtenidas, se determinaron las coordenadas colorimétricas CIE $L^*a^*b^*$ y CIE L^*C^* , ya que una definición numérica del color es esencial como parámetro de calidad de las pastas. En la figura 4.30 se recogen las coordenadas colorimétricas correspondientes a las pastas blanqueadas obtenidas con la secuencia de blanqueo más eficaz (LEP incluyendo LMS en la primera etapa) junto con las correspondientes a las pastas sin blanquear.

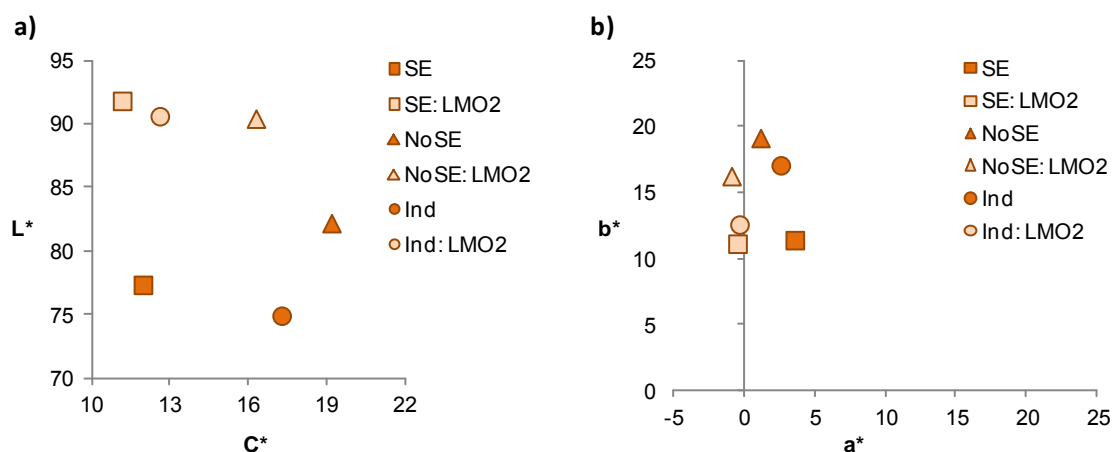


Figura 4.30. Propiedades colorimétricas de las pastas sin blanquear (símbolos oscuros) y bioblanqueadas (símbolos claros): a) coordenadas CIE L^*C^* , b) coordenadas CIE $L^*a^*b^*$.

Tras la secuencia de bioblanqueo, todas las pastas mostraron un aumento de L^* y una reducción de C^* , es decir, un aumento en la luminosidad y una disminución del color. Aunque la reducción del color fue menor para la pasta SE:LMO₂, esta pasta mostró el valor más bajo de color C^* y el más alto de luminosidad L^* , sugiriendo que la

explosión por vapor ayuda a producir pastas con mejores propiedades colorimétricas. A la misma conclusión se llega a partir de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ mostradas en la figura 4.30b. La secuencia de bi blanqueo redujo tanto la coordenada a^* como la b^* y los valores más bajos se encontraron en la pasta SE:LMO₂.

La figura 4.31 muestra la reflectancia frente a la longitud de onda para las distintas pastas bi blanqueadas y sin blanquear. Como se esperaba, la secuencia de blanqueo LEP aumentó la reflectancia de las pastas sin blanquear, llevándola a valores más cercanos al blanco ideal (100% reflectancia para todas las longitudes de onda en el visible) después del blanqueo. La pasta pre-tratada con explosión por vapor, mostró la reflectancia más alta tras el blanqueo (SE:LMO₂), pese a que esta pasta sin blanquear mostró valores de reflectancia para longitudes de onda superiores a 440nm más bajos que aquellos mostrados por la pasta NoSE. Además, para una longitud de onda de 457nm (a la cual se mide la blancura), las diferencias en reflectancia entre la pasta SE:LMO₂ y las demás fueron mayores, como mostraron los valores de blancura (figura 4.28).

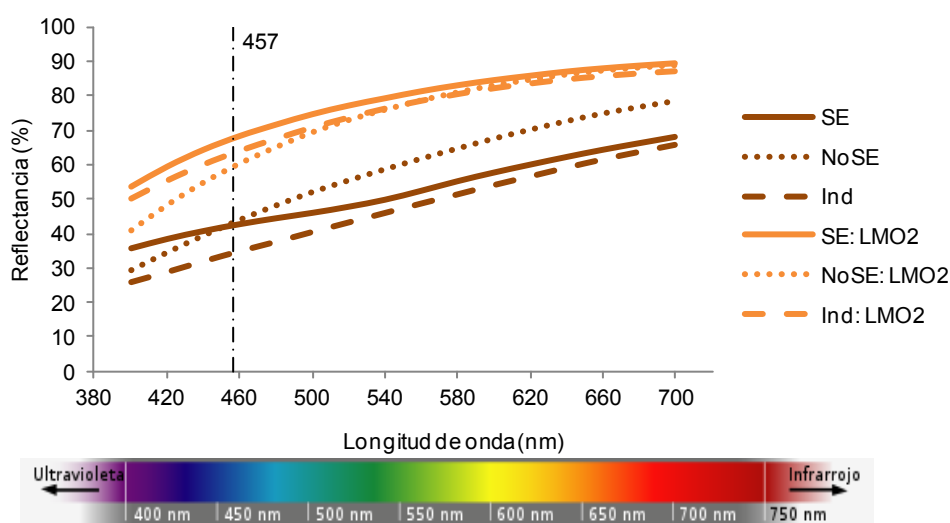


Figura 4.31. Curvas de reflectancia de las pastas sin blanquear y bi blanqueadas.

◆ Consumo de peróxido de hidrógeno

El consumo de peróxido de hidrógeno se evaluó en todos los experimentos (tabla 4.4) observando un menor consumo en las pastas pre-tratadas mediante explosión por vapor. Estas pastas presentaron un contenido en ácidos hexenurónicos muy bajo, debido a la eliminación de hemicelulosas durante el pre-tratamiento, como se observó en el apartado 4.3.1. Teniendo en cuenta que los ácidos hexenurónicos consumen reactivos de

blanqueo (Ragnar, 2001; Vuorinen et al., 1999), es lógico esperar un menor consumo de peróxido de hidrógeno durante el blanqueo de dichas pastas. Otros autores también observaron una reducción en el consumo de reactivos de blanqueo cuando se llevó a cabo un pre-tratamiento con autohidrólisis (Mendes et al., 2009).

Tabla 4.4. Consumo de peróxido de hidrógeno en los diferentes ensayos llevados a cabo.

Ensayo	Consumo de peróxido de hidrógeno (%)
Ind: No-LMO ₂	79,5%
Ind: LMO ₂	59,1%
NoSE: No-LMO ₂	77,6%
NoSE: LMO ₂	66,8%
SE: No-LMO ₂	55,7%
SE: LMO ₂	54,0%
SE: LM-NoO ₂	51,2%

Paralelamente, se observaron menores consumos cuando el sistema LMS se añadió en la primera etapa de blanqueo, debido a la oxidación y eliminación de lignina durante el tratamiento LMS y la consecutiva extracción alcalina. Además, parte de la lignina que permanece en la pasta fue parcialmente oxidada por el sistema lacasa – mediador, y como consecuencia, la necesidad de un reactivo de blanqueo oxidante, como el peróxido de hidrógeno, fue menor.

Finalmente, se observó una pequeña disminución en el consumo de peróxido de hidrógeno cuando no se añadió oxígeno en la etapa enzimática. Teniendo en cuenta los resultados encontrados para el número kappa y la blancura, este resultado corrobora que la adición de oxígeno no es un factor esencial ya que no reduce el consumo de reactivos ni mejora la calidad de la pasta obtenida.

♦ **Envejecimiento acelerado**

Para estudiar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor y del tratamiento enzimático en la estabilidad de las propiedades ópticas de las pastas blanqueadas, se sometieron las pastas a un envejecimiento acelerado. El envejecimiento acelerado se llevó a cabo a 80°C y 65% de humedad relativa durante 6 días, de acuerdo con la norma ISO 5630-3.

En la tabla 4.5 se muestran los valores de índice de amarilleamiento y blancura de las pastas blanqueadas antes y después del envejecimiento. En todos los casos se observó un aumento del índice de amarilleamiento y una reducción de la blancura debido al efecto del calor y la humedad en las pastas. Sin embargo, la respuesta al envejecimiento de las pastas puede deberse a múltiples factores, como el contenido en lignina, en ácidos hexenurónicos y en hemicelulosa (Sevastyanova et al., 2005; Vuorinen et al., 1999). Así, el efecto mayor se observó en las pastas industriales, mientras que las pastas SE y NoSE mostraron una estabilidad parecida frente al envejecimiento, aunque algo superior en el caso de las pastas no pre-tratadas. No obstante, las pastas pre-tratadas con explosión por vapor presentaron valores más bajos de índice de amarilleamiento y más altos de blancura, incluso después del envejecimiento. De forma análoga, Mendes et al. (2009) observaron una menor reversión de la blancura en las pastas de eucalipto obtenidas con un pre-tratamiento de autohidrólisis. Estos autores asociaron este comportamiento a la eliminación de compuestos específicos de la madera y/o reacciones en la madera que previenen de la formación de leuco-cromóforos, mejorando la estabilidad de la blancura en las pastas blanqueadas.

Tabla 4.5. Influencia del envejecimiento acelerado en la blancura e índice de amarilleamiento de las pastas blanqueadas industrial, control y con pre-tratamiento de explosión por vapor.

	Blancura			Índice de amarilleamiento		
	Original ^a	Envej. ^b	Reducción	Original ^a	Envej. ^b	Aumento
Ind: No-LMO ₂	52,9	38,9	15,3	29,7	40,1	10,4
Ind: LMO ₂	63,3	44,7	19,3	23,7	35,4	11,7
NoSE: No-LMO ₂	57,5	53,1	4,5	29,7	31,8	2,2
NoSE: LMO ₂	59,2	54,9	4,3	29,7	31,4	1,8
SE: No-LMO ₂	66,0	60,8	5,2	20,4	23,6	3,2
SE: LMO ₂	67,3	62,6	4,7	20,8	22,9	2,1
SE: LM-NoO ₂	68,5	61,8	6,7	20,2	23,9	3,7

^a Antes del envejecimiento acelerado

^b Después del envejecimiento acelerado

En la tabla 4.5 también se puede observar el efecto del tratamiento LMS en la estabilidad de las propiedades ópticas frente al envejecimiento. A excepción de en las pastas industriales, el tratamiento enzimático mejoró la estabilidad de las pastas,

reduciendo las variaciones en la blancura y el índice de amarilleamiento. Este efecto fue más acusado en las pastas pre-tratadas con explosión por vapor, sugiriendo que la combinación de ambos tratamientos puede ser más ventajosa en términos de estabilidad óptica. Ambos tratamientos han demostrado su efecto en la reducción del contenido en ácidos hexenurónicos de las pastas, lo que podría determinar la mayor estabilidad óptica de dichas pastas, de acuerdo con lo observado por Cadena et al. (2010).

Finalmente, cuando no se añadió oxígeno en el tratamiento enzimático (SE:LM-NoO₂), tanto la blancura como el índice de amarilleamiento fueron menos estables que en la pasta SE:LMO₂. Por tanto, aunque la adición de oxígeno no mejoró las propiedades ópticas de la pasta blanqueada obtenida, ni redujo el consumo de peróxido de hidrógeno, sí aumentó la estabilidad de las propiedades ópticas de la pasta, justificando así su adición en el tratamiento enzimático.

4.4 - Combinación de tratamientos de explosión por vapor y LMS antes del pasteado como alternativa al biopulpeo con hongos

En este apartado se propone una alternativa al sistema de biopulpeo convencional con hongos ligninolíticos. Como se ha indicado en el apartado 2.4.2, la rápida descompresión en el pre-tratamiento de explosión por vapor provoca una separación de fibras y rotura de las paredes de las fibras, que facilitará la penetración de las enzimas en el biopulpeo. Por ello, y siguiendo dentro del esquema de biorrefinería con extracción de hemicelulosa planteado en la presente tesis doctoral, se ha estudiado si la aplicación de enzimas entre el pre-tratamiento de explosión por vapor y el pasteado Kraft mejora la deslignificación y reduce el consumo de reactivos químicos, haciendo más viable la aplicación industrial del biopulpeo enzimático (Publicación VI). De esta forma se resolverían algunos de los problemas asociados al uso de hongos en el biopulpeo, reduciendo el tiempo necesario para el pre-tratamiento de 2-3 semanas a unas pocas horas.

La figura 4.32 muestra las partes del proceso de biorrefinería forestal en las que se centra este apartado.

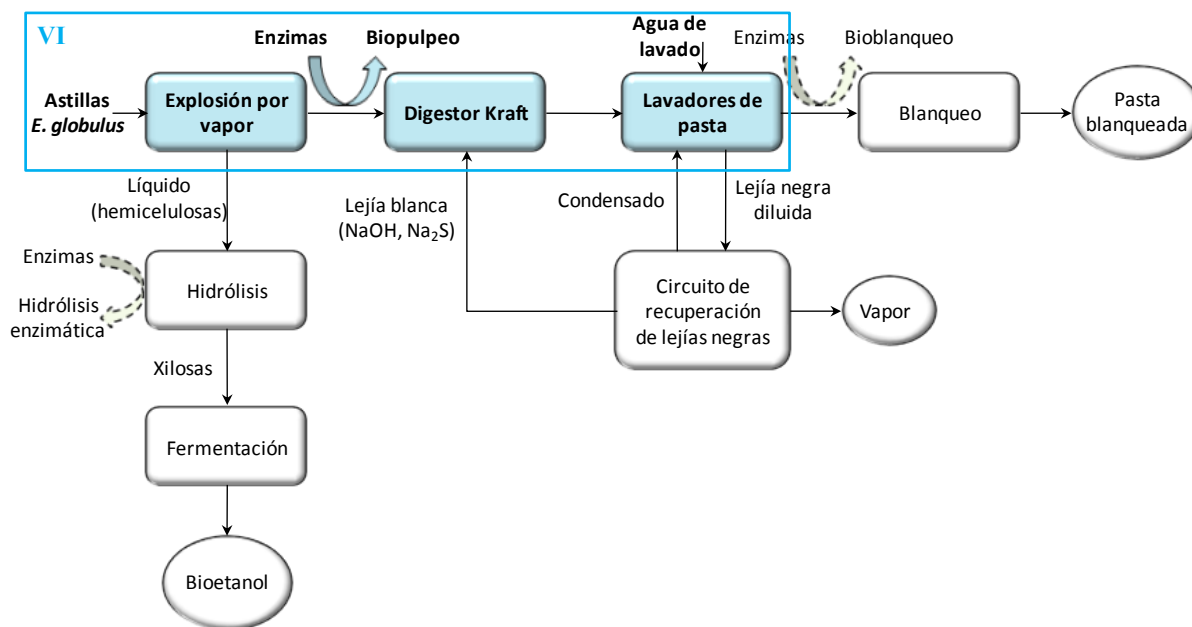


Figura 4.32. Esquema del proceso de biorrefinería forestal estudiado, indicando las partes del proceso en las que se centran la publicación VI.

Por tanto, según se indica en la figura 4.32, las etapas del sistema de biopulpeo propuesto serán: pre-tratamiento mediante explosión por vapor, seguida de un

tratamiento enzimático y de un pasteado Kraft. Para evaluar la eficacia de este proceso de biopulpeo, los resultados obtenidos se compararon con aquellos obtenidos con la muestra sin tratamiento enzimático, y también con la muestra sin tratamiento combinado de explosión por vapor y enzimático. Además, se llevó a cabo un estudio control de biopulpeo con dos hongos ligninolíticos, para comparar los resultados del biopulpeo enzimático propuesto, con los obtenidos mediante un proceso de biopulpeo convencional.

4.4.1 - Biopulpeo basado en explosión por vapor y tratamiento enzimático (SE+LMS)

Antes del tratamiento enzimático, las astillas de *E. globulus* se sometieron a un pre-tratamiento de explosión por vapor para obtener un material más accesible que permita una actuación más eficaz de las enzimas. Las condiciones del pre-tratamiento se seleccionaron en función de lo estudiado en el apartado 4.1, eligiendo aquellas que proporcionaron una fracción sólida con una estructura más abierta y una mayor extracción de hemicelulosas. Al igual que en el apartado 4.3, en el que se estudió el pasteado Kraft, el pre-tratamiento seleccionado fue el SE8, que consiste en una pre-extracción en agua a 25°C seguida de dos ciclos de explosión por vapor de 10 y 3 minutos a 183°C.

Después del pre-tratamiento de explosión por vapor, las astillas se sometieron a tratamientos enzimáticos preliminares en los que se estudió la eficacia tanto de xilanasas como del sistema lacasa – mediador para mejorar el pasteado consecutivo. A partir de estos ensayos preliminares se seleccionó el tratamiento a 40°C con sistema lacasa – mediador como el más eficaz, y se planteó un diseño experimental para ajustar las condiciones óptimas del tratamiento. Se estudiaron como variables el tiempo de tratamiento (1, 3 o 5 horas) y la dosis de lacasa (3,0, 16,5 y 30,0 UA/g de biomasa seca), evaluando su efecto en un pasteado Kraft posterior y en la calidad de las pastas obtenidas. Se empleó como control un tratamiento consistente en pre-tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado Kraft, para poder diferenciar y cuantificar las mejoras debidas al tratamiento enzimático y las debidas al pre-tratamiento de explosión por vapor (estudiadas en el apartado 4.3.1).

En la figura 4.33 se muestra la influencia del tratamiento enzimático en el rendimiento del pasteado, el consumo de reactivos y la calidad de las pastas (número kappa y viscosidad).

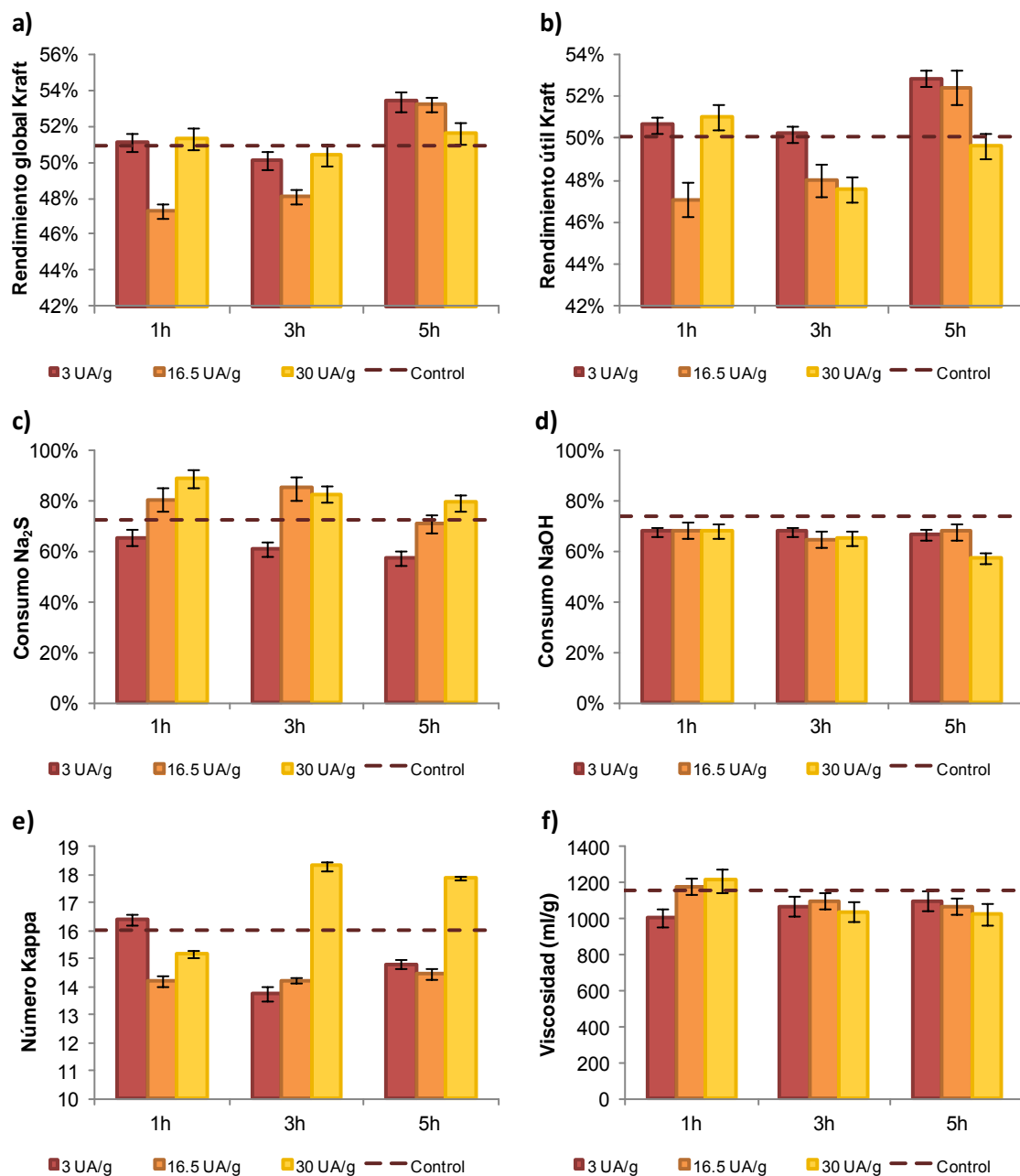


Figura 4.33. Efecto en el pasteado del tratamiento con LMS tras un pre-tratamiento de explosión por vapor: rendimientos global (a) y útil (b) del pasteado, consumo de Na₂S (c) y NaOH (d) y número kappa (e) y viscosidad (f) de las pastas obtenidas. El control consistió en un tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado Kraft, sin tratamiento enzimático.

Aunque no se observó una relación clara entre el tiempo de tratamiento enzimático y el rendimiento del pasteado Kraft, los mayores rendimientos se obtuvieron para los tratamientos más largos (5 horas). El rendimiento útil disminuyó al aumentar la dosis de lacasa utilizada, excepto para 1 hora de tratamiento con 30 UA/g. Por tanto, se obtuvo el mayor rendimiento útil para un tratamiento de 5 horas con una dosis de lacasa de 3 UA/g, seguido del mismo tratamiento con una dosis de lacasa de 16,5 UA/g: 52,9% y 52,4% respectivamente, frente a 50,1% para el tratamiento control. A partir de estos resultados, se puede concluir que para aumentar el rendimiento del pasteado fueron necesarias al menos 5 horas de tratamiento enzimático, y que incluso en este caso, dosis altas de lacasa fueron perjudiciales.

El consumo de NaOH durante el pasteado de las astillas pre-tratadas enzimáticamente fue menor que el consumo para el tratamiento control (en torno a 67% en la mayoría de las muestras tratadas, frente a 74,2% para el control), observándose el menor consumo de NaOH tras un tratamiento de 5 horas con 30UA/g (58%). Sin embargo, el consumo de Na₂S obtenido para las muestra tratadas con dosis altas y medias de lacasa fue mayor que el encontrado para la muestra control, mientras que para dosis de 3 UA/g se observó una reducción en el consumo. Por tanto, si se emplean dosis bajas de lacasa se podrá reducir tanto el consumo de NaOH como el de Na₂S, pero éste último aumentará al aumentar la dosis de lacasa. Si la lacasa o el mediador se unen a las fibras durante el tratamiento enzimático, podrían reaccionar con la lejía de cocción durante el pasteado, explicando el aumento del consumo de reactivos al aumentar la dosis enzimática. Por otro lado, la reducción del consumo de reactivos químicos durante el pasteado se debe probablemente a que la lignina parcialmente oxidada durante el tratamiento LMS necesitará menos reactivos para solubilizarse en la lejía cocción.

Comparada con el control, se obtuvo una mayor deslignificación de las muestras pre-tratadas con LMS sin una degradación importante de las fibras, ya que las diferencias en viscosidad no fueron significativas. El mayor grado de deslignificación se observó cuando el tratamiento enzimático se llevó a cabo durante 3 horas con 3UA/g, obteniéndose una pasta con un número kappa de 13,7 (aumento en deslignificación del 13,9% comparado con el control cuyo número kappa fue 16). Al prolongar el tiempo de tratamiento, con la misma dosis enzimática, se obtuvo un número kappa mayor, pero todavía significativamente menor que el control (14,8 frente 16,0). Aumentos significativos en la deslignificación respecto al control fueron encontrados también al

utilizar una dosis enzimática de 16,5 UA/g, independientemente del tiempo de tratamiento, obteniendo pastas con número kappa entre 14,2 y 14,4. Sin embargo, cuando se utilizaron dosis altas de lacasa (30 UA/g) y tiempo de tratamiento de 3 y 5 horas, el número kappa de las pastas resultantes fue más alto que el de la pasta control. Estos datos indican posible unión del LMS a las fibras (Dyer y Ragauskas, 2004), como también parecía indicar el aumento en el consumo de reactivos. Por tanto, para aumentar la deslignificación fueron necesarias al menos 3 horas de tratamiento cuando se usaron dosis bajas de lacasa, mientras que 1 hora de tratamiento fue suficiente con dosis medias de lacasa (16,5 UA/g). Sin embargo, tratamientos con altas dosis de lacasa durante más de 1 hora causaron una disminución en el grado de deslignificación.

A partir de las pastas obtenidas se formaron hojas, y se determinaron sus propiedades mecánicas y ópticas (figura 4.34). Las pastas no se refinaron antes de la formación de las hojas y mostraron un grado de refino en torno a 15 °SR. Todas las hojas mostraron una densidad aparente semejante, en torno a 0,39 g/cm³, indicando una cantidad de finos y un grado de fibrilación similar (Helmerius et al., 2010). Los índices de tracción y de desgarro obtenidos para las distintas muestras fueron similares a los presentados por la pasta control, aunque pequeñas variaciones se pudieron observar con el tratamiento enzimático de 1 hora. Por el contrario, Petit-Conil et al. (2002) observaron un aumento en las propiedades mecánicas al aplicar un tratamiento LMS antes del pasteado termomecánico de madera de abeto. Esta diferencia de resultados se deben probablemente al uso de una madera de conífera en lugar de una de frondosa como el eucalipto, y de un proceso de pasteado diferente.

Respecto a las propiedades ópticas, los cambios en opacidad normalmente están relacionados con cambios en la blancura del papel (papeles más oscuros muestran opacidades más altas), sin embargo, la opacidad también depende de la capacidad para dispersar la luz del papel (Maijala et al., 2008). Aunque las muestras tratadas enzimáticamente presentaron propiedades ópticas muy próximas a las de la pasta control, se pudo observar una disminución de la opacidad al aumentar la dosis de lacasa y el tiempo de tratamiento, excepto para 5 horas de tratamiento. Por el contrario, la blancura mostró un pequeño aumento con el tiempo de tratamiento en la mayoría de los casos, pero no mostró relación con la dosis de lacasa. La blancura más alta (1 punto por encima del control) se observó cuando se llevó a cabo un tratamiento de 5 horas con dosis media de lacasa. Por tanto, a pesar de conseguir un aumento en la deslignificación

del 13,9% al aplicar un tratamiento enzimático de 3 horas y 3 UA/g, estas condiciones no causaron un aumento en la blancura comparado con el tratamiento control. Estos resultados corroboran los obtenidos por Dyer y Ragauskas (2004) quienes, no encontraron diferencias en el color tras el pasteado Kraft, a pesar de observar un oscurecimiento de las astillas tras el tratamiento LMS.

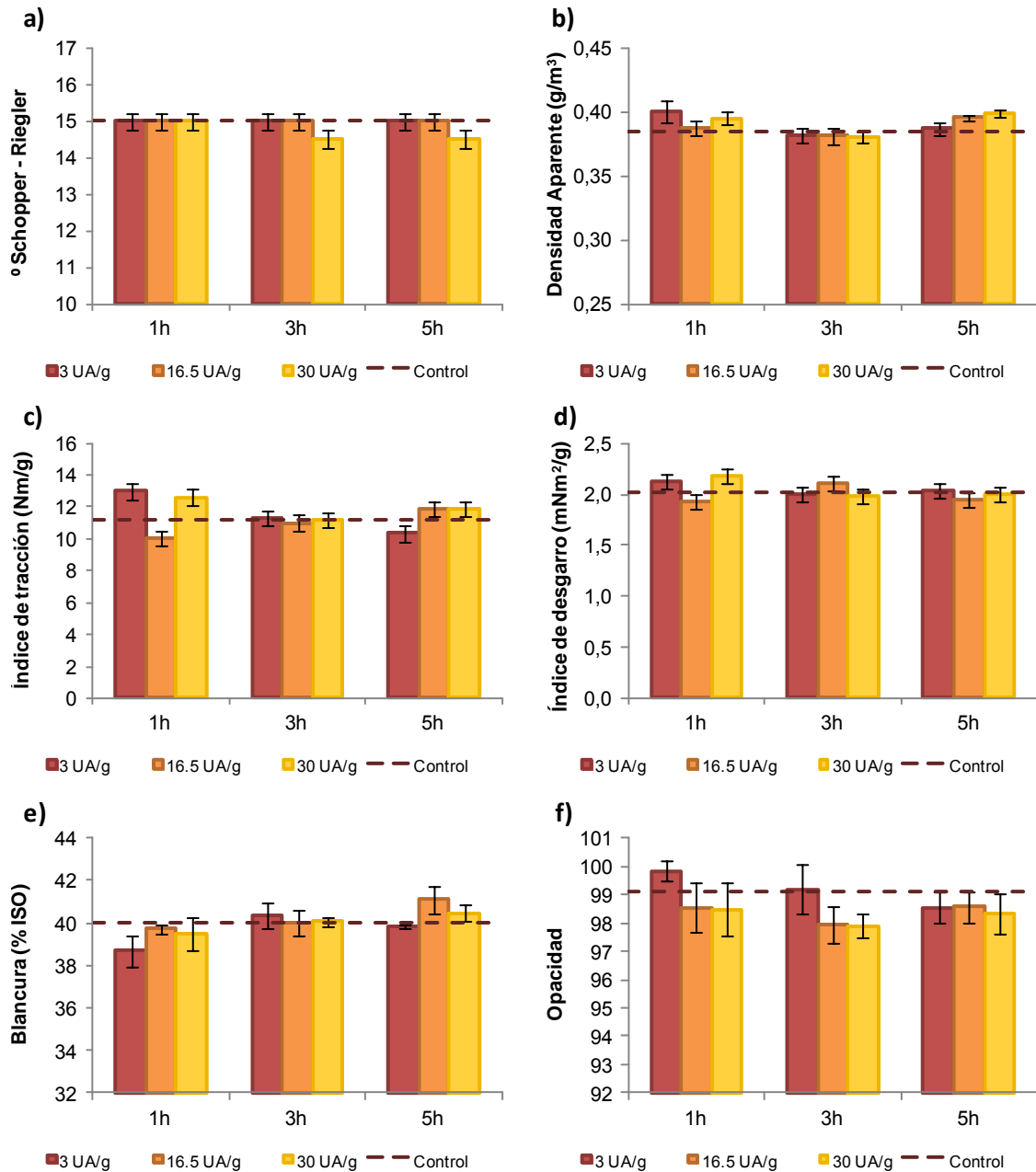


Figura 4.34. Efecto del tratamiento con LMS tras un pre-tratamiento de explosión por vapor en las propiedades mecánicas y ópticas del papel: a) grado de refinó, b) densidad aparente, c) índice de tracción, d) índice de desgarro, e) blancura y f) opacidad. El control consistió en un tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado Kraft, sin tratamiento enzimático.

A partir de estos resultados, se puede concluir que al aplicar un tratamiento LMS a 40°C con 3 UA/g y durante 3 horas, después de un pre-tratamiento de explosión por vapor y antes del pasteado Kraft de *E. globulus*, se obtuvieron pastas con menor número kappa (reducción de 2,3 unidades) que aquellas obtenidas mediante un pre-tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado Kraft. Este tratamiento no mostró efectos negativos en las propiedades mecánicas y ópticas de las pastas obtenidas, proporcionó rendimientos útiles similares a los obtenidos con las pastas control y redujo el consumo de Na₂S y NaOH un 11,5% y un 6,3% respectivamente. El aumento en la deslignificación (13,9%) fue mayor que el 8,7% obtenido por Dyer y Ragauskas (2004) cuando aplicaron un tratamiento lacasa-HBT a 45°C durante 2 horas antes del pasteado Kraft de *Pinus taeda*. El mayor aumento en la deslignificación observado en la presente tesis, puede deberse a pequeñas diferencias en las condiciones del tratamiento enzimático y/o a diferencias en la materia prima usada. Sin embargo, es más probable que este aumento se deba a la adición de un pre-tratamiento de explosión por vapor antes del tratamiento enzimático, ya que dicho tratamiento ha demostrado mejorar la difusión de los reactivos en el pasteado, como se ha visto en el apartado 4.3.1 (Ahvazi et al., 2007) y favorecer la hidrólisis enzimática de biomasa, apartado 4.2.2 (Jurado et al., 2009; Ruiz et al., 2008; Wu et al., 1999). Además, debido a la reducción del número kappa como consecuencia sólo del pre-tratamiento de explosión por vapor antes del pasteado, estudiada en el apartado 4.3.1 (67,8%), el aumento total en la deslignificación, incluyendo el tratamiento enzimático se incrementó hasta un 72,4% respecto al pasteado Kraft convencional. En otras palabras, al combinar ambos pre-tratamientos, el pasteado podría acortarse de 60 a 25 minutos obteniendo una pasta con un número kappa menor que la pasta control, que contribuiría al menor consumo de reactivos de blanqueo y al aumento de la productividad.

4.4.2 - Biopulpeo con hongos ligninolíticos

Para comparar los resultados obtenidos mediante biopulpeo basado en explosión por vapor y tratamiento LMS, con aquellos obtenidos mediante un proceso de biopulpeo más convencional, las astillas de *E. globulus* se sometieron a tratamientos con hongos ligninolíticos de pudrición blanca: *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes* sp. I-62. Antes del tratamiento con hongos no se aplicó un tratamiento de explosión por vapor, porque los hongos son capaces de penetrar y transportar las enzimas al interior de las astillas

(Messner y Srebotnik, 1994). Sin embargo, la presencia o ausencia de determinados extractos puede afectar al tratamiento fúngico. Por ello, las astillas se sometieron a extracción con acetona (AC), extracción con agua caliente (W) o a la combinación de ambos (AC+W) antes del tratamiento fúngico, y los resultados se compararon con los obtenidos con astillas sin extraer (NoE).

En primer lugar se estudió el efecto de las extracciones, sin inoculación del hongo, en el pasteado Kraft, comparando los resultados con los obtenidos con astillas sin ninguna extracción (tabla 4.6). Cuando se llevó a cabo una extracción con acetona, el rendimiento del pasteado aumentó, mientras el número Kappa y el consumo de reactivos disminuyó. Sin embargo, la reducción en el número Kappa fue más significativa cuando se llevó a cabo una extracción en agua caliente, obteniendo incrementos en la deslignificación del 29,4% después del pasteado Kraft. Al llevar a cabo una extracción en acetona antes de la extracción en agua (AC+W), la reducción observada en el número kappa fue prácticamente la misma que sólo con la extracción en agua. El aumento de deslignificación puede explicarse por la eliminación de extractos, que mejorará la difusión de la lejía de cocción (Ferraz et al., 2008). Además, durante la extracción con agua caliente se produce una pequeña hidrólisis de los polisacáridos, que facilitará la deslignificación.

Tabla 4.6. Influencia de las diferentes extracciones en la calidad de las pastas y en el proceso Kraft.

	Número Kappa	Δ Kappa ^b (%)	Δ Viscosi. ^b (%)	Rto Kraft ^a (%)	Δ Rto Kraft ^b	Consumo de reactivos	
						$\Delta\%Na_2S^b$	$\Delta\%NaOH^b$
NoE	15,6			49,9			
AC	15,0	-4,1	+12,1	55,9	+6,0	-3,7	-1,9
W	11,0	-29,4	+5,9	51,8	+1,9	+7,0	+0,3
AC+W	11,3	-27,6	+13,1	51,9	+2,1	-0,4	-0,5

^a Rendimiento útil del proceso Kraft sin incluir el rendimiento del pretratamiento.

^b Respecto al control sin pre-tratamiento de explosión por vapor (NoSE)

Las astillas, extraídas y no extraídas, se sometieron a un tratamiento con *Pycnoporus sanguineus* o *Trametes* sp I-62. En la figura 4.35 se muestra la colonización del hongo en las astillas a los 28 días de tratamiento, observando mayor colonización y actividad lacasa en las muestras extraídas con acetona o sin extracción.



Figura 4.35. Colonización de los hongos (P: *Pycnoporus sanguineus*; T: *Trametes* sp. I-62) tras 28 días de tratamiento en astillas sin extraer (NoE), extraídas con acetona (AC), extraídas con agua (W) y extraídas con acetona y agua (AC+W).

Tras el tratamiento fúngico, se llevó a cabo un pasteado Kraft. Los resultados observados se compararon con los de las pastas control obtenidas aplicando la misma extracción pero sin inoculación fúngica (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Influencia del tratamiento fúngico en la calidad de las pastas y en el proceso Kraft comparado con controles con la misma extracción pero sin inoculación fúngica.

	Número Kappa	Δ Kappa ^b (%)	Δ Viscosi. ^b (%)	Rto Kraft ^a (%)	Δ Rto Kraft ^b	Consumo de reactivos	
						$\Delta\%Na_2S^b$	$\Delta\%NaOH^b$
NoE - P	15,8	+0,8	+2,1	49,8	-0,1	+2,6	+0,2
NoE - T	14,2	-9,3	+3,4	48,4	-1,5	+5,9	+0,5
AC - P	14,5	-3,7	-5,1	51,9	-4,0	+4,3	+1,7
AC - T	13,6	-9,5	-15,0	53,3	-2,6	+5,6	+2,4
W - P	11,9	+7,9	+1,6	50,0	-1,8	-3,4	+0,3
W - T	10,8	-2,0	-1,8	50,4	-1,4	+0,5	+0,9
AC + W - P	12,4	+9,0	-20,4	51,6	-0,3	+5,7	+1,2
AC + W - T	12,5	+10,2	-3,0	52,4	+0,5	+4,9	+1,4

^a Rendimiento útil del proceso Kraft sin incluir el rendimiento del pretratamiento.

^b Respecto al control con la misma extracción pero sin inoculación fúngica

Se encontraron pequeñas diferencias en el rendimiento útil del pasteado de las muestras biotratadas y las muestras control; sin embargo, si se tienen en cuenta las pérdidas de peso durante el tratamiento fúngico, el rendimiento total del biopulpeo fue aproximadamente un 5% menor que el rendimiento para las pastas control, debido a la degradación de los polisacáridos por parte de los hongos. Por otro lado, el consumo de NaOH y especialmente el de Na₂S fue mayor en las pastas biotratadas comparado con sus controles. A pesar de estas desventajas, el tratamiento con *Trametes* sp. I-62 mejoró el pasteado, ya que gracias a este pre-tratamiento se obtuvieron pastas con menor número kappa en todos los casos, excepto en las muestras AC+W. En cambio, el tratamiento con *Pycnoporus sanguineus* no mejoró la deslignificación en las condiciones ensayadas, contrariamente a lo observado por Wolfaardt et al. (2004). Sin embargo estos autores usaron una cepa distinta de *Pycnoporus sanguineus*, lo que puede influir de manera importante en los resultados, como han observado otros autores con distintas cepas de hongos de pudrición blanca (Akhtar et al., 1993; Blanchette et al., 1992).

Al comparar las pastas biotratadas con las pastas control sometidas a la misma extracción, las mayores reducciones en el número kappa debidas al efecto del hongo se encontraron cuando las astillas no habían sido pre-extraídas y después de una extracción con acetona. Estas muestras fueron las que mayor colonización del hongo y mayor actividad lacasa mostraron, como se ha visto anteriormente. Sin embargo, considerando el proceso global, el número kappa más bajo se obtuvo con las astillas pre-extraídas con agua caliente y tratadas con *Trametes* sp. I-62.

4.4.3 - Comparación entre biopulpeo SE+LMS y biopulpeo fúngico

El biopulpeo más eficaz de entre los ensayados en esta tesis, consistió en un pre-tratamiento de explosión por vapor seguido de un tratamiento LMS a 40°C durante 3 horas, con una dosis de lacasa de 3 UA/g, como se concluyó en el apartado 4.4.1. Este tratamiento con LMS, aplicado después de un pre-tratamiento de explosión por vapor, proporcionó pastas con menor número kappa y menor consumo de reactivos que los tratamientos con xilanasa llevados a cabo en los ensayos preliminares y que los tratamientos con xilanasa llevados a cabo por Zhao et al. (2002) antes de un pasteado alcalino de paja de trigo.

Comparado con los tratamiento fúngicos (apartado 4.4.2), el tratamiento de explosión por vapor más LMS resultó más eficiente en términos de tiempo de tratamiento, deslignificación, ahorro de reactivos químicos y rendimiento del pasteado. Resultados similares fueron encontrados por Ramos et al. (2004) quienes compararon un tratamiento enzimático usando un crudo de *Phanerochaete chrysosporium* con el tratamiento directo con dicho hongo antes de un pasteado termo-mecánico y de un pasteado quimi-termo-mecánico.

Aunque con el pre-tratamiento de explosión por vapor, el rendimiento total del proceso (SE, LMS y pasteado) se reducirá hasta aproximadamente un 40%, la producción de pasta en una hipotética fábrica podría mantenerse debido a la reducción del tiempo de pasteado necesario. Además, la corriente de hemicelulosas podría utilizarse para obtener productos de valor añadido, como se ha comentado anteriormente, aliviando además la carga de la caldera de recuperación. Esta es una de las principales ventajas frente al tratamiento con hongos, en el que la pérdida de rendimiento se debe a la degradación de los polisacáridos, que imposibilita su posterior utilización.

4.5 - Utilización de *Hesperaloe funifera* en el esquema de biorrefinería forestal planteado

En este apartado se evalúa la utilización de *Hesperaloe funifera* en el esquema de biorrefinería forestal planteado (Publicación VII). Su uso podría ser una buena alternativa en áreas secas y/o con escasos recursos forestales, debido a sus propiedades hídricas y a las buenas propiedades que presentan las pastas obtenidas a partir de esta especie (McLaughlin, 2000; McLaughlin y Schuck, 1991; Wong y McLaughlin, 2000). Además, este material se ha elegido para evaluar las posibles ventajas derivadas de su estructura menos compacta, en comparación con el *E. globulus*, esperando una mayor eficacia de las etapas enzimáticas (biopulpeo y bioblanqueo).

En la figura 4.36 se indican las partes del proceso de biorrefinería forestal en las que se centra este apartado, en el cual el *E. globulus* ha sido sustituido por el *H. funifera* como materia prima.

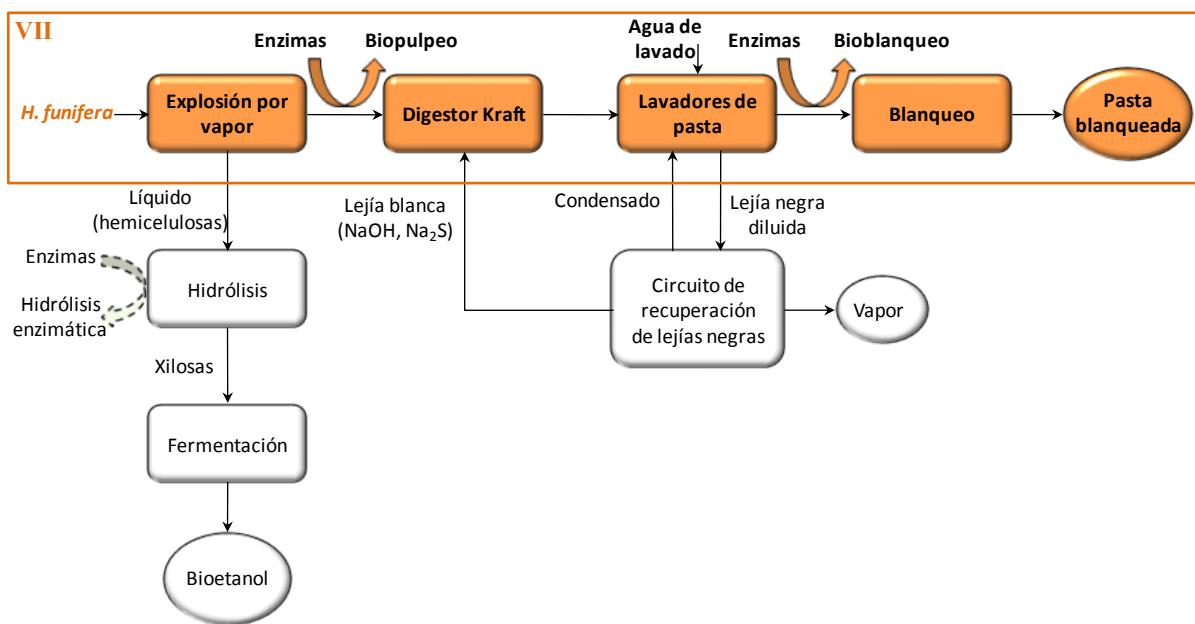


Figura 4.36. Esquema del proceso de biorrefinería forestal, indicando las partes del proceso en las que se centran la publicación VII que utiliza *H. funifera* como materia prima.

Como se observa en la figura 4.36, en esta apartado se ha llevado a cabo un pre-tratamiento de explosión por vapor seguido de un pasteado Kraft y un blanqueo. Además, se ha evaluado el efecto de añadir una etapa enzimática LMS entre el pre-tratamiento y el pasteado, siguiendo el esquema de biopulpeo propuesto en el apartado 4.4. Por último, se evaluó también el efecto de la adición de una etapa LMS en el

blanqueo de las pastas Kraft pre-explosionadas y no pre-tratadas, para determinar si da lugar a una mejora en las propiedades de la pasta y una reducción en el consumo de reactivos de blanqueo, como se observó con *E. globulus* en el apartado 4.3.2.

4.5.1 - Caracterización de *Hesperaloe funifera*

H. funifera mostró un alto contenido en cenizas (5,2%), extractos en acetona (3,1%) y extractos en agua caliente (15,9%), lo que indica que el rendimiento del pasteado será bajo. Sin embargo, el bajo contenido en lignina (9,4% lignina Klason y 3,6% lignina soluble) comparado con otras materias primas madereras y no madereras, hará que el pasteado sea más fácil, compensando la reducción en el rendimiento. En cuanto al contenido en azúcares, mostró un contenido en glucosa similar al *E. globulus* (44,7% frente 46,0%) y un contenido en xilanos y grupos acetilos algo menor (10,1% frente 15,6%, y 2,2% frente 4,1% respectivamente), aunque obviamente mayor que el de las maderas de coníferas.

En cuanto a las características de las fibras de *H. funifera*, el análisis biométrico mostró unas fibras muy largas y delgadas (4,2 mm de longitud y 7,2 μm de anchura) comparado no solo con especies madereras, como *Picea abies* (3,5 mm y 36 μm), *Pinus taeda* (4,0 mm y 43 μm) o *Eucalyptus saligna* (1,0 mm y 19 μm) (McLaughlin y Schuck, 1991), sino también con materiales no madereros, como el sisal (3,0 mm y 17 μm) o la paja de trigo (1,5 mm y 13 μm) (Fairbank y Detrick, 2000). Debido a la alta relación L/D del *H. funifera* se espera que proporcione más uniones entre fibras mejorando la resistencia del papel.

4.5.2 - Pre-tratamiento de explosión por vapor

Los tallos de *H. funifera* se sometieron a dos pre-tratamientos de explosión por vapor, cuyas condiciones se muestran en la tabla 4.8. Las condiciones del tratamiento SE2' se seleccionaron en base al estudio llevado a cabo con *E. globulus* en el apartado 4.1, y corresponden al tratamiento SE8. Sin embargo, debido a que los materiales no madereros presentan una estructura menos compacta y más porosa que las maderas (Sánchez et al., 2011), es razonable esperar que necesiten un tratamiento de explosión por vapor menos intenso. Por ello, el tratamiento SE1' consistió en 1 ciclo de 3 minutos a 183°C, en lugar de los dos ciclos del tratamiento SE2'. En ambos tratamientos se llevó

a cabo una pre-extracción en agua fría similar a la llevada a cabo en los tratamientos con *E. globulus*.

Como se observa en la tabla 4.8, al aumentar la severidad del pre-tratamiento disminuyó el rendimiento del mismo, como se esperaba, ya que aumenta también la cantidad de hemicelulosas extraídas (Al-Dajani et al., 2009; Li et al., 2010). El rendimiento obtenido con *H. funifera* en las condiciones SE2' fue menor que el obtenido con *E. globulus* en las mismas condiciones (SE8) (62,5% frente 79,3%). La extracción de hemicelulosas no explicó esta pérdida de rendimiento, ya que aunque el porcentaje de hemicelulosas extraído en el *H. funifera* fue algo mayor (56,8% frente 46,6%) el contenido inicial fue menor, como se ha indicado en el apartado anterior. Sin embargo, el *H. funifera* presentó un alto contenido en material extraíble en agua caliente (15,9% frente a 1,8% en el *E. globulus*), lo que sí conlleva una reducción del rendimiento en el pre-tratamiento de explosión por vapor.

Tabla 4.8. Condiciones y rendimiento del pre-tratamiento de explosión por vapor y capacidad de retención de agua de las fracciones sólidas obtenidas.

	HP	SE1'	SE2'
Pre-extracción	No	Sí	Sí
1 ^{er} ciclo (min)	-	3	10
2 ^o ciclo (min)	-	-	3
Severidad S ₀	-	2,92	3,56
Rendimiento (%)	-	81,9	62,5
% agua retenida ^a	267	359	434

^aCapacidad de retención de agua expresada como gramos de agua por 100 gramos de muestra seca.

El *H. funifera* sin pre-tratar (HP) mostró una capacidad de retención de agua mucho más alta que el *E. globulus* sin pre-tratar (267 frente 65 g de agua por 100 g de muestra seca) y similar a la del *E. globulus* tras un pre-tratamiento de explosión por vapor equivalente a SE2' (272 g de agua por 100 g de muestra seca). Puesto que la capacidad de retención de agua proporciona información acerca de los cambios en la estructura interna del material y de su accesibilidad a los reactivos, estos resultados sugieren que el *H. funifera* sin ningún pre-tratamiento ya muestra una estructura igual de accesible que la del *E. globulus* sometido a una explosión por vapor equivalente a

SE2' (SE8). Otros autores ya observaron en los materiales no-madereros una estructura más porosa y accesible que los madereros (Alaejos et al., 2004; Sánchez et al., 2011).

Tras someter el *H. funifera* a un pre-tratamiento de explosión por vapor se observó un aumento de la capacidad de retención de agua, mayor cuanto más severo fue el pre-tratamiento. Así, se alcanzaron valores de 359 y 434 g de agua por 100 g de muestra seca tras los pre-tratamientos SE1' y SE2' respectivamente.

4.5.3 - Efecto del pre-tratamiento en el pasteado Kraft y en el biopulpeo de *H. funifera*

H. funifera sin tratar (HP) y pre-tratado (SE1' y SE2') se sometió a un pasteado Kraft para estudiar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor. Estos ensayos sirvieron de control para estudiar el efecto del biopulpeo, basado en la adición de una etapa enzimática con LMS entre el pre-tratamiento y el pasteado. Se utilizó además un segundo control, en el cual se llevó a cabo un tratamiento idéntico al tratamiento enzimático pero sin adición de LMS, es decir, sólo en presencia de tampón (control-tampón).

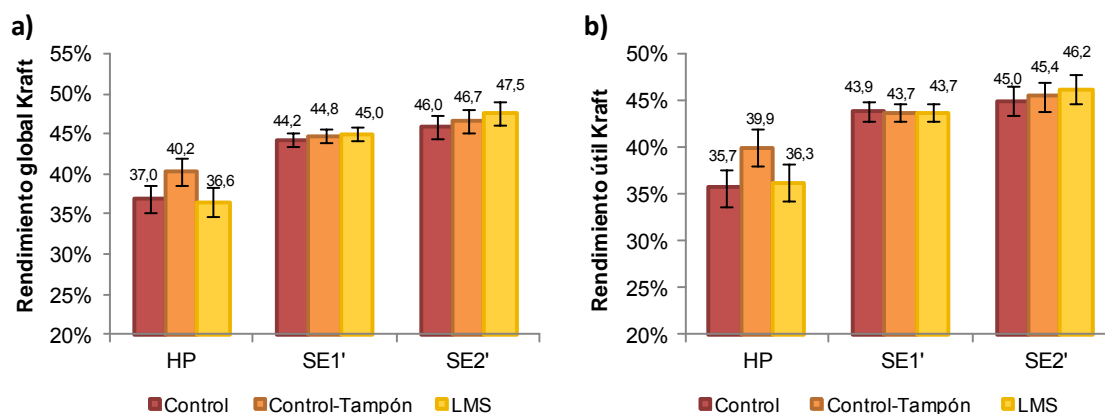


Figura 4.37. Rendimiento global (a) y útil (b) del pasteado para *H. funifera* tras un pre-tratamiento de explosión por vapor (SE1' y SE2') y un tratamiento con LMS. Se incluyen los controles sin explosión por vapor (HP), sin adición de LMS (control-tampón) y sin etapa enzimática (control).

En la figura 4.37 se muestran los rendimientos global y útil del proceso de pasteado para cada muestra. Ambos rendimientos fueron muy similares, debido al bajo contenido en incocidos o rechazos de todas las muestras (aprox. 1%). La eliminación de extractos durante el tratamiento de explosión por vapor aumentó el porcentaje relativo

de celulosa antes del pasteado (de 44,7% en HP a 49,5% en SE2') aumentando tanto el rendimiento global como el útil en SE1' y SE2'. Sin embargo, si se tiene en cuenta el rendimiento del pre-tratamiento, el rendimiento total del proceso para HP, SE1' y SE2' fue 37%, 36% y 29% respectivamente. En cuanto al tratamiento enzimático, no supuso diferencias significativas en el rendimiento del proceso.

La calidad de las pastas obtenidas se muestra en la figura 4.38, donde se observa una reducción del número kappa cuando se llevó a cabo el pre-tratamiento de explosión por vapor. Esta reducción fue más pronunciada al aumentar la severidad del pre-tratamiento (17,8% y 28,4% para SE1' y SE2' respectivamente). Sin embargo, estas reducciones fueron mucho más pequeñas que las observadas con *E. globulus*, donde se obtuvo una reducción del 67,8% después de un tratamiento equivalente a SE2' (SE8). Estos resultados pueden deberse a que el *H. funifera* ya tiene una estructura accesible, como mostró la capacidad de retención de agua, y un aumento en esta accesibilidad no implica una mejora en la difusión de los reactivos tan grande como en el caso del *E. globulus*. A pesar de ello, el aumento de deslignificación durante el pasteado de *H. funifera*, debido al pre-tratamiento de explosión por vapor fue mayor que los observados por Sánchez et al. (2011) con otros pre-tratamientos, como autohidrólisis e hidrólisis ácida, antes del pasteado sosa-antraquinona de *H. funifera*.

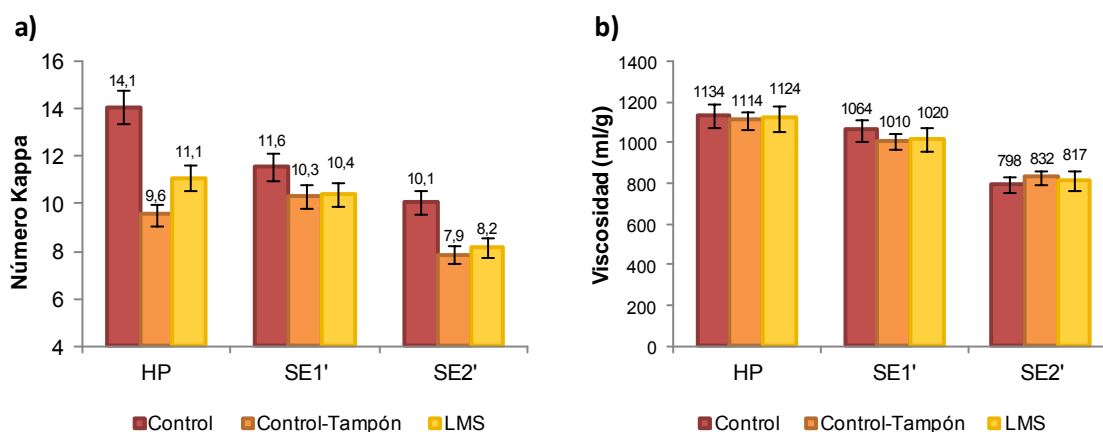


Figura 4.38. Número kappa (a) y viscosidad (b) de las pastas Kraft de *H. funifera* tras un pre-tratamiento de explosión por vapor (SE1' y SE2') y un tratamiento con LMS. Se incluyen los controles sin explosión por vapor (HP), sin adición de LMS (control-tampón) y sin etapa enzimática (control).

Por otro lado, se observó una reducción en el número kappa cuando se llevó a cabo un tratamiento enzimático. Esta reducción fue una consecuencia del tratamiento

con tampón (pH 6) a 40°C durante 5 horas y no de la acción enzimática, ya que no se observó aumento en el efecto al añadir LMS en el tratamiento. Es decir, el aumento en la deslignificación debido al tratamiento de explosión por vapor y al tratamiento enzimático se debió probablemente a la eliminación de extractos durante el tratamiento con vapor o agua a temperatura alta o moderada, respectivamente. Así, con el tratamiento enzimático de *H. funifera* no pre-tratado, se observó una reducción en el número kappa similar a la debida al pre-tratamiento de explosión por vapor, señalando que un tratamiento a 183°C durante 13 minutos dio lugar a resultados similares a los causados por un tratamiento a 40°C durante 5 horas. Cuando se llevaron a cabo ambos pre-tratamientos, la reducción en el número kappa fue mayor cuanto más severo fue la explosión por vapor. Sin embargo, la adición de LMS en las muestras HP supuso un aumento en el número kappa, comparado con el control sólo con tampón. Este resultado puede indicar enlaces entre el LMS y las fibras de las pastas, que producen un mayor consumo de permanganato potásico en la determinación del número kappa (Dyer y Ragauskas, 2004). Para conseguir un aumento de la deslignificación mediante el pre-tratamiento LMS se deberán llevar a cabo más experimentos que permitan optimizar las condiciones de operación (dosis de lacasa, tiempo de tratamiento, etc.) de manera similar al estudio llevado a cabo con el *E. globulus* en el apartado 4.4.1.

La figura 4.38b) muestra una reducción de la viscosidad asociada al pre-tratamiento de explosión por vapor, que aumenta al aumentar la severidad del pre-tratamiento. Sin embargo, la degradación de las fibras no fue tan intensa como la observada al llevar a cabo pre-tratamientos de autohidrólisis e hidrólisis ácida antes del pasteado sosa-antraquinona de *H. funifera* (Sánchez et al., 2011). Por otro lado, el tratamiento enzimático no causó variaciones significativas en la viscosidad.

El consumo de reactivos durante el pasteado se evaluó por medio del álcali activo (AA) y la sulfidez (S) residuales en la lejía negra. El uso del pre-tratamiento de explosión por vapor originó un aumento en el AA residual (4,0, 4,6 y 5,4 para los controles HP, SE1' y SE2' respectivamente) como se observa en la tabla 4.9, indicando una reducción en el consumo de reactivos (NaOH y Na₂S). Estos resultados se deben probablemente a la eliminación de hemicelulosas durante el pre-tratamiento, que se degradarían durante el pasteado Kraft a ácidos carboxílicos consumiendo cantidades significativas de álcali (San Martin et al., 1995). Por otro lado, la adición del tratamiento LMS aumentó el consumo de Na₂S (reducción de la sulfidez residual desde

aproximadamente 23 para los controles y controles-tampón hasta 17,0, 17,4 y 18,0 para HP-LMS, SE1'-LMS y SE2'-LMS respectivamente). Un efecto similar se observó en el biopulpeo con LMS de *E. globulus* (apartado 4.4.1) cuando se utilizaron dosis altas de lacasa. Sin embargo, el álcali activo residual mostró que el consumo total de reactivos no varió de manera significativa al añadir LMS en el tratamiento enzimático.

Tabla 4.9. Álcali activo (AA) y sulfidez (S) residual en las leñas negras obtenidas tras el pasteado Kraft de las distintas muestras.

Muestra	AA residual	S residual
HP - Control	4,0	23,1
HP - Control-tampón	4,9	24,4
HP - LMS	4,7	17,0
SE1' - Control	4,6	25,0
SE1' - Control-tampón	3,9	20,3
SE1' - LMS	3,8	17,4
SE2' - Control	5,4	19,8
SE2' - Control-tampón	4,5	22,1
SE2' - LMS	5,1	18,0

A partir de estos resultados, se puede concluir que el pre-tratamiento de explosión por vapor aumentó la deslignificación en un consecutivo pasteado Kraft reduciendo el consumo de reactivos, siendo SE2' el pre-tratamiento más eficaz. Las pastas obtenidas mostraron números kappa inferiores y viscosidades superiores a las obtenidas por otros autores mediante otros pre-tratamientos como autohidrólisis o hidrólisis ácida. Sin embargo, el efecto del mismo pre-tratamiento de explosión por vapor en el *E. globulus* fue mayor. Por otro lado, la adición de un pre-tratamiento LMS entre la explosión por vapor y el pasteado Kraft no mostró mejoras significativas en la calidad de las pastas obtenidas, siendo necesario un estudio más detallado de las variables de operación.

En cuanto a las propiedades mecánicas del papel obtenido, se observó un aumento del índice de desgarrar y una reducción del índice de estallido debido al pre-tratamiento de explosión por vapor. El mismo efecto fue observado por Sánchez et al. (2011) tras pre-tratamientos de autohidrólisis e hidrólisis ácida de *H. funifera*. Helmerius et al. (2010) también obtuvieron resultados similares tras diferentes pre-

tratamientos de extracción de hemicelulosa de abedul. Sin embargo, en el caso del *E. globulus*, aunque se observó una reducción en el índice de estallido debido a la eliminación de hemicelulosas durante el pre-tratamiento, se obtuvieron índices de desgarrar similares para la pasta pre-tratada y la pasta control, como se indicó en el apartado 4.3.1. En la figura 4.39 se pueden comparar los valores de ambos índices obtenidos para el *E. globulus* a distintos grados de refino y para el *H. funifera* sin refinar. Como puede observarse, el *H. funifera* sin refinar mostró un índice de desgarrar muy superior a todas las muestras de *E. globulus*. Dicho índice para el *H. funifera* sin pre-tratar fue similar al obtenido por McLaughlin (2000) en pastas sin refinar del mismo material obtenidas mediante pasteado sosa-antraquinona. Cuando dicho autor sometió las pastas a refino, el índice de desgarrar disminuyó progresivamente, efecto contrario al observado con *E. globulus*. Por otro lado, el índice de estallido del *H. funifera* pre-tratado fue similar al obtenido tras 3000 revoluciones en refino PFI con pasta *E. globulus* pre-tratada. Así mismo, dicho índice para el *H. funifera* sin pre-tratar fue similar al de la pasta industrial de *E. globulus* tras 1000 revoluciones PFI. Por tanto, el *H. funifera* puede proporcionar pastas con una resistencia mecánica elevada, similar a la de pastas madereras refinadas, debido a las propiedades morfológicas de sus fibras (largas, delgadas y con una pared celular muy fina) que aumentan los puntos de unión entre fibras (Fairbank y Detrick, 2000; McLaughlin, 2000; Wong y McLaughlin, 2000).

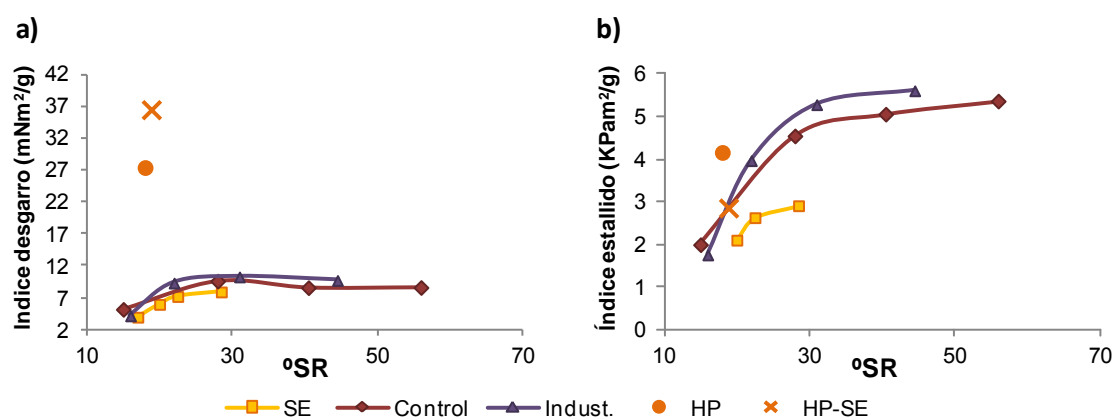


Figura 4.39. Índices de desgarrar (a) y de estallido (b) para pastas de *Hesperaloe funifera* sin refinar sometidas al pre-tratamiento SE2' (HP-SE) y no pre-tratadas (HP). Se muestran también los índices obtenidos a distintos grados de refino con pastas de *E. globulus* sin pre-tratar (control e industrial) y sometida a un pre-tratamiento similar a SE2' (SE).

4.5.4 - Efecto del pre-tratamiento en el bioblanqueo de *H. funifera*

Las pastas control HP, SE1' y SE2' se sometieron a una secuencia TCF de blanqueo, incluyendo una primera etapa enzimática para estudiar el efecto del pre-tratamiento de explosión por vapor en el bioblanqueo de *H. funifera*. Como control, se utilizó la misma secuencia LEP pero sin adición de LMS en la etapa enzimática (-Lc).

En la figura 4.40 se muestra la evolución del número kappa y la viscosidad durante las distintas etapas del blanqueo. Para todas las pastas ensayadas, se observó una reducción del número kappa después de cada etapa, mientras la viscosidad permaneció aproximadamente constante durante todo el proceso de blanqueo. El tratamiento LMS contribuyó en todas las pastas a aumentar la reducción del número kappa sin disminuir la viscosidad. Lo que indica que, al igual que otros autores observaron con otras materias primas (Eugenio et al., 2010a; Fillat et al., 2010; Oudia et al., 2008), se puede conseguir una biodeslignificación significativa del *H. funifera* sin degradar las cadenas de celulosa.

Al aumentar la severidad del pre-tratamiento de explosión por vapor, se observó una mayor deslignificación durante el blanqueo LEP, coincidiendo con lo observado por Josefsson et al. (2002) después de blanqueo químico de pastas de álamo pre-tratadas con explosión por vapor. Así, al final de la secuencia de blanqueo, se obtuvieron reducciones en el número kappa del 48,1% y 53,1% para SE2'-Lc y SE2'-L respectivamente, mientras que la pasta sin pre-tratar mostró unas reducciones del número kappa de 36,6% y 42,4% para HP-Lc y HP-L respectivamente. Por tanto, la adición de un pre-tratamiento de explosión por vapor antes del pasteado Kraft mejoró tanto el blanqueo químico como el bioblanqueo de *H. funifera*. Los resultados obtenidos con esta materia prima, fueron muy similares a los obtenidos mediante el mismo proceso con *E. globulus*, en el que se obtuvieron reducciones del número kappa del 41,7% y 54,5% para las pastas pre-tratadas blanqueadas sin y con adición de LMS en la primera etapa del blanqueo, respectivamente.

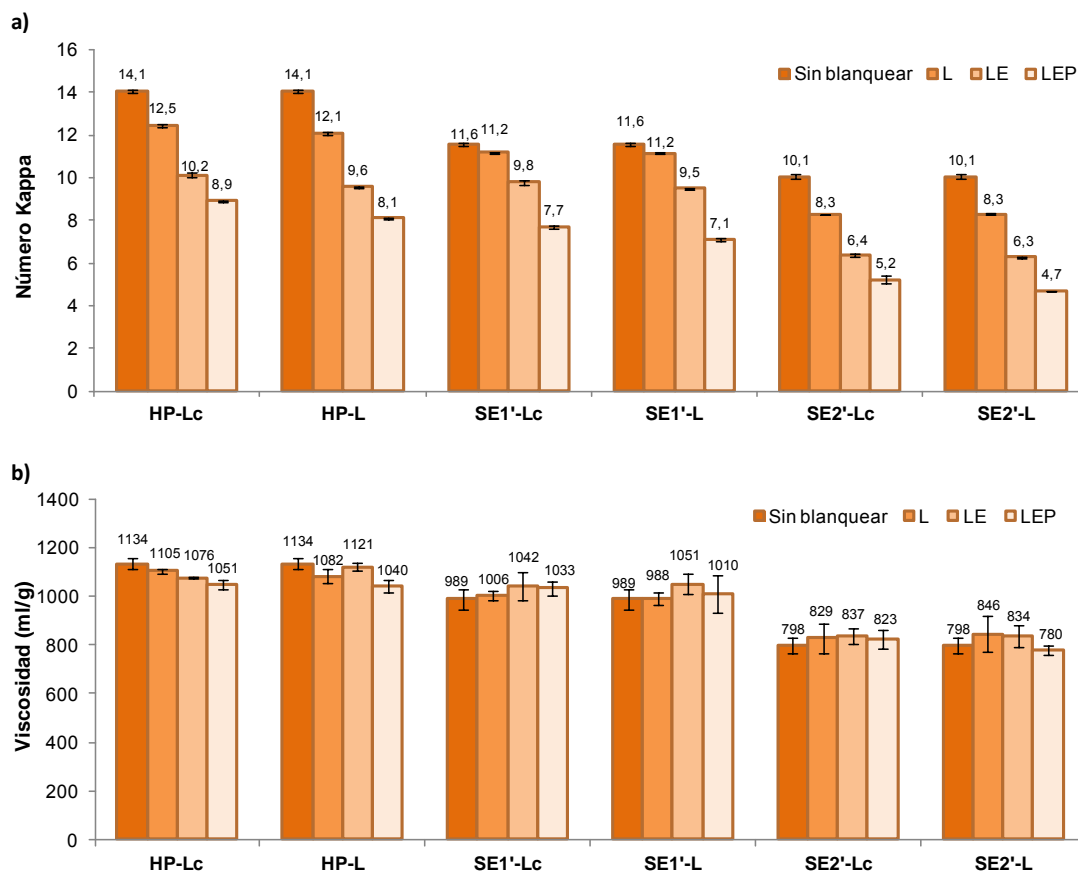


Figura 4.40. Evolución del número kappa (a) y la viscosidad (b) durante la secuencia de bioblanqueo (LEP) para *H. funifera* sin tratar (HP) y con pre-tratamiento de explosión por vapor (SE1' y SE2'). Se incluye un control sin adición de LMS (-Lc).

Los cambios en las propiedades ópticas de las pastas se muestran en la figura 4.41. Como cabía esperar, se observó un aumento de la blancura después de cada etapa de la secuencia de blanqueo LEP, produciéndose el mayor aumento en el tratamiento con peróxido de hidrógeno (P). Al añadir LMS, la blancura de las pastas finales aumentó en todos los casos, por lo que se probó que el tratamiento LMS mejora el blanqueo de las pastas Kraft de *H. funifera*, al igual que se ha observado previamente con otras materias primas (Eugenio et al., 2010a; Fillat et al., 2010; Vivekanand et al., 2008).

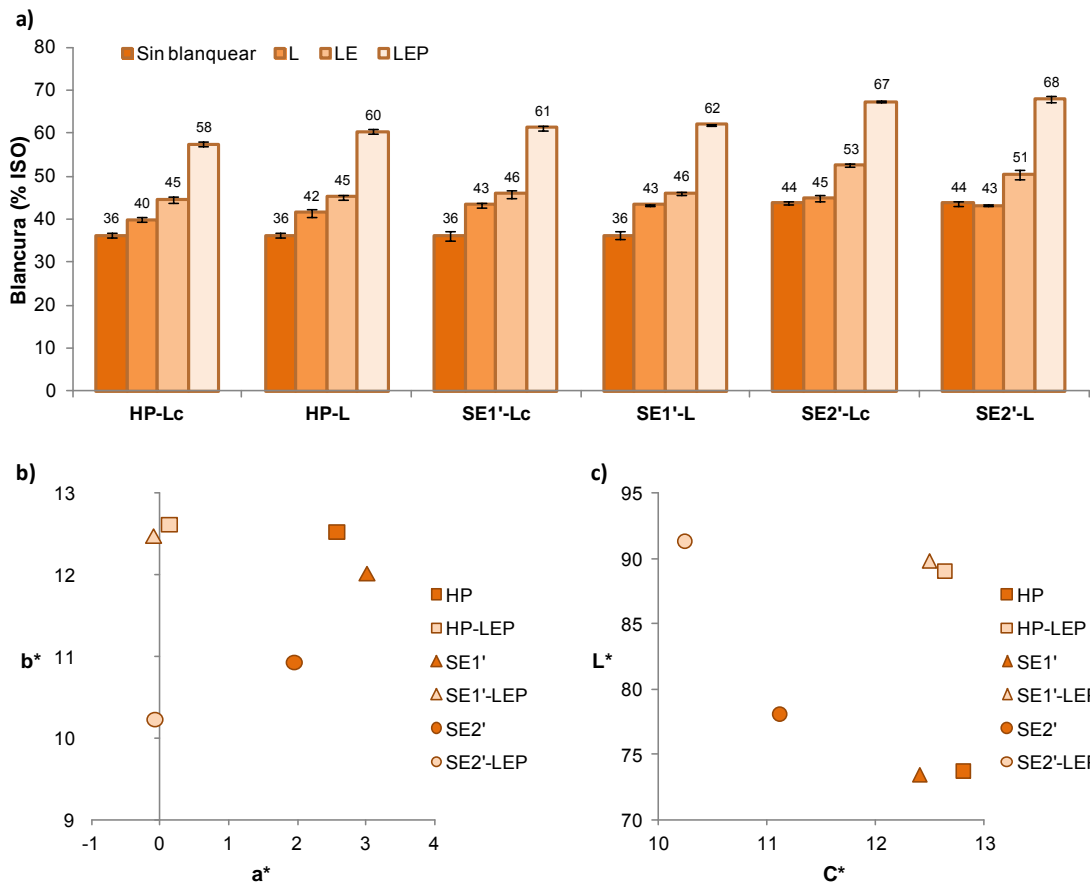


Figura 4.41. Propiedades ópticas de las pastas biBlanqueadas de *H. funifera* sin tratar (HP) y con pre-tratamiento de explosión por vapor (SE1' y SE2'): a) evolución de la blancura en la secuencia LEP; b) coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ y c) coordenadas CIE L^*C^* para pastas sin blanquear (símbolos oscuros) y biBlanqueadas (símbolos claros).

Las pastas pre-tratadas mediante explosión por vapor presentaron una blancura mayor que las pastas sin pretratar, que aumentó al incrementar la severidad del pre-tratamiento y al incluir un tratamiento con LMS en la secuencia de blanqueo. Además de la blancura, el color del papel es una propiedad muy importante en diferentes aplicaciones y una buena base blanca es necesaria cuando los productos se van a teñir, imprimir o colorear. Por esta razón, se midieron también las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ y CIE L^*C^* en las pastas antes y después del biBlanqueo (figura 4.41b y 4.41c). En todas las pastas se observó una reducción de la coordenada a^* (que indica la posición entre el rojo y el verde) después del biBlanqueo, llegando a valores de a^* muy próximos al valor neutro ideal (0). Sin embargo, en las muestras sin pre-tratar (HP) la coordenada b^* (posición entre el amarillo y el azul) apenas cambia durante el blanqueo, e incluso aumenta (más amarillo) para las pastas pre-tratadas SE1'. Por el contrario, cuando se llevó a cabo un pre-tratamiento más intenso (SE2'), se observó una

disminución de la coordenada b^* al final de la secuencia de blanqueo. De esta forma, la coordenada C^* , que indica la distancia al color neutro perfecto, disminuye en la pasta bioblanqueada SE2' pero permanece aproximadamente constante para las pastas SE1' y HP. En cuanto a la luminosidad, la coordenada L^* aumenta en todas las muestras después del bioblanqueo. De acuerdo con estos resultados, el pre-tratamiento de explosión por vapor más severo (SE2') mejoró las propiedades ópticas de la pasta final blanqueada de *H. funifera*, no sólo aumentando la blancura y la luminosidad, sino también reduciendo el color, al igual que se observó en el caso del *E. globulus*. Sin embargo, un pre-tratamiento menos severo (SE1') no mejoró las propiedades colorimétricas de las pastas bioblanqueadas comparado con las pastas no pre-tratadas.

Tabla 4.10. Consumo de peróxido de hidrógeno medido a partir de los efluentes de la etapa P.

Muestra	Consumo H_2O_2 (%)
HP-Lc	90,3
HP-L	92,7
SE1-Lc	87,5
SE1-L	88,0
SE2-Lc	66,1
SE2-L	68,1

Otra ventaja del pre-tratamiento de explosión por vapor fue la reducción del consumo de peróxido de hidrógeno durante el blanqueo. Como se puede observar en la tabla 4.10, un pre-tratamiento más intenso dio lugar a un consumo menor de peróxido de hidrógeno, observando una reducción del 24,6% con el pre-tratamiento SE2'. Un comportamiento similar se observó en el caso del *E. globulus*, en el que el pre-tratamiento de explosión por vapor redujo la cantidad de ácidos hexenurónicos en la pasta sin blanquear, reduciendo por tanto el consumo de reactivos de blanqueo. Sin embargo, cuando se llevó a cabo un tratamiento LMS, se observó un pequeño aumento del consumo de peróxido de hidrógeno en todas las pastas de *H. funifera*, contrariamente a lo observado en el caso del *E. globulus* y por otros autores utilizando distintas materias primas (Eugenio et al., 2010a; Valls y Roncero, 2009). Sin embargo, se debe tener en cuenta, que las pastas obtenidas al final de la secuencia que incluye LMS presentaron un número kappa menor y una blancura mayor, y por tanto, si se comparan pastas con similar deslignificación y nivel de blancura, el consumo de

reactivos en las pastas con tratamiento LMS sería probablemente menor que en las pastas control.

Por tanto, el LMS contribuyó a aumentar la blancura y reducir el número kappa al final de la secuencia de blanqueo, consumiendo sólo en torno a un 2% más de peróxido de hidrógeno. Estas mejoras en la calidad de la pasta blanqueada se vieron incrementadas al añadir un pre-tratamiento de explosión por vapor antes del pasteado Kraft, consiguiendo además disminuir el consumo de peróxido de hidrógeno un 24,6%. Es decir, la combinación de ambos tratamientos permite obtener pastas con bajo contenido en lignina y buenas propiedades colorimétricas y de blancura, utilizando menor cantidad de reactivos de blanqueo.



CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Las principales conclusiones que se desprenden del trabajo realizado en la presente tesis doctoral son las siguientes:

- 1) El tratamiento de explosión por vapor es un método eficaz para extraer selectivamente las hemicelulosas del material lignocelulósico, aumentando su extracción al aumentar la severidad del tratamiento. Mediante un tratamiento consistente en una pre-extracción con agua fría seguido de dos ciclos de explosión por vapor de 10 y 3 minutos a 183°C, se extrajo el 47% de los xilanos y el 93% de los arabanos presentes en *Eucalyptus globulus* sin degradar significativamente la celulosa. Además, provocó la solubilización de una pequeña parte de la lignina presente en el material original. La lignina remanente en la fracción sólida mostró un menor contenido en subestructuras β -O-4 debido a reacciones de despolimerización, aumentando la fracción de lignina soluble en álcali. Sin embargo, también tuvieron lugar reacciones de repolimerización, que provocaron la condensación de la lignina, aumentando su temperatura de degradación y haciendo más difícil la extracción de la lignina residual.
- 2) Dicho tratamiento modificó también la estructura interna del material lignocelulósico, proporcionando una fracción sólida con una estructura más abierta y accesible. Por ello, se observó un aumento en la capacidad de retención de agua de la fracción sólida, que se incrementó al aumentar la severidad del tratamiento. Se observó también un aumento del volumen de macroporos, mientras el volumen de mesoporos disminuyó, aumentando la accesibilidad pero disminuyendo el área superficial del material. Por ello, dependiendo de la naturaleza del proceso al que se someta el material, se deberán ajustar las condiciones del tratamiento.
- 3) El conjunto de cambios químicos y estructurales causados por el tratamiento de explosión por vapor, lo convierte en un pre-tratamiento adecuado en el proceso de pasteado Kraft. Se consigue de esta forma adaptar dicho proceso al concepto de biorrefinería lignocelulósica en el que se obtiene una fracción líquida rica en hemicelulosas que podrá utilizarse para la obtención de bioetanol u otros productos de alto valor añadido.

- 4) En la fracción líquida recogida durante el pre-tratamiento de explosión por vapor, se detectaron principalmente xilooligosacáridos, que pueden ser utilizados como fuente de azúcares para la producción de bioetanol. La hidrólisis enzimática de dicha fracción proporcionó mejores rendimientos que la hidrólisis ácida y además permitió operar en condiciones suaves que no favorecen la generación de productos inhibidores. El rendimiento alcanzado en la hidrólisis enzimática fue del 83%. Para aumentar el rendimiento de la hidrólisis y sobre todo de la posterior fermentación, sería interesante estudiar el efecto de detoxificación de esta corriente líquida mediante la aplicación de tratamientos con sistema lacasa-mediador.
- 5) Se estudió también la hidrólisis enzimática de la fracción sólida, planteando la producción de bioetanol como alternativa a la producción de pastas. Se observó un aumento del rendimiento de hidrólisis al aumentar la severidad del pre-tratamiento y al añadir un tratamiento LMS antes de la hidrólisis enzimática. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el aumento de la severidad favorecerá las reacciones de degradación de los polisacáridos, reduciendo la recuperación de xilooligosacáridos en la fracción líquida y aumentando la generación de productos inhibidores. Por ello, la aplicación de un pre-tratamiento no muy severo junto con tratamientos de detoxificación con LMS mejorarán el rendimiento global de obtención de azúcares. Sin embargo, con los pre-tratamientos estudiados, la cantidad de azúcares obtenidos a partir de la fracción sólida sólo representó el 12,3% del material original. Este dato, junto con el alto precio de la pasta Kraft, señalan el pasteado Kraft como la mejor opción para aprovechar esta fracción sólida y dejaría la opción del bioetanol para el aprovechamiento de la fracción líquida.
- 6) La estructura abierta del residuo sólido obtenido tras el pre-tratamiento de explosión por vapor mejoró la difusión de los reactivos en un consecutivo pasteado Kraft, aumentando la deslignificación en un 70%. Alternativamente, el tiempo de pasteado podría reducirse de 60 a 25 minutos obteniendo pastas de similar grado de deslignificación, disminuyendo el consumo de energía de pasteado y pudiendo aumentarse la productividad de una hipotética fábrica. Sin embargo, el rendimiento en pasta del proceso disminuyó desde un 50% hasta un

40%. Aunque las pastas obtenidas necesitaron mayor energía durante el refino, las propiedades mecánicas fueron sólo ligeramente inferiores.

- 7) El proceso de blanqueo se vio favorecido por el pre-tratamiento, debido a la disminución de ácidos hexenurónicos en las pastas. Al añadir una etapa enzimática (LMS) en la secuencia de blanqueo, se combinaron las ventajas del pre-tratamiento SE y del tratamiento enzimático, obteniendo pastas con un número kappa inferior, una blancura superior y propiedades colorimétricas mejores que las de las pastas control. Además, se redujo el consumo de peróxido de hidrógeno en un 20%.
- 8) Añadiendo una etapa enzimática con LMS entre el pre-tratamiento de explosión por vapor y el pasteado Kraft, se obtuvo una alternativa viable al biopulpeo convencional con hongos ligninolíticos. La adición de esta etapa enzimática mejoró la deslignificación en un 13,9% sin afectar el rendimiento del pasteado ni las propiedades mecánicas de las pastas obtenidas, y reduciendo el consumo de reactivos de cocción. Con este proceso se evitan algunas de los inconvenientes de la aplicación del biopulpeo con hongos a nivel industrial, como son los largos tiempos de tratamiento, pasando de semanas a horas, y la pérdida de rendimiento del proceso debido a la degradación de los polisacáridos por los hongos.
- 9) La utilización de *Hesperaloe funifera* como materia prima en el esquema de la biorrefinería propuesto puede ser una buena alternativa en áreas secas y/o con escasos recursos forestales. Mediante el pre-tratamiento de explosión por vapor se consiguió extraer el 57% de los xilanos y las pastas Kraft obtenidas sin refinar mostraron unas propiedades similares a las del *E. globulus* refinado. El efecto del pre-tratamiento SE en el pasteado fue menor que el observado en el caso del *E. globulus*, mientras que el efecto en el blanqueo fue similar con ambas materias primas. Por otro lado, la adición de un tratamiento LMS entre el pre-tratamiento SE y el pasteado Kraft no mejoró la deslignificación en las condiciones ensayadas. Sin embargo, la adición del tratamiento LMS en la primera etapa de la secuencia de blanqueo mejoró el efecto positivo del pre-tratamiento SE, obteniéndose mayores incrementos de blancura y mayores reducciones en el número kappa y en el consumo de peróxido de hidrógeno.

CONCLUSIONS

The main conclusions of the work conducted in this doctoral thesis are the following:

- 1) Steam explosion is an efficient method to selectively extract the hemicelluloses of the lignocellulosic material, increasing the extraction by intensifying the severity of the treatment. A treatment consisting of cold water pre-extraction followed by two steam explosion cycles of 10 and 3 minutes at 183°C, 47% of the xylan and 93% of the arabinan present in *Eucalyptus globulus* wood were extracted while the cellulose remained almost undegraded. In addition, this treatment caused the solubilization of a small part of the lignin in the raw material. The lignin remaining on the solid fraction proved to have less β -O-4 substructures as a result of depolymerization reactions, which augmented the alkali soluble lignin fraction. However, repolymerization reactions also took place, causing lignin condensation, increasing its degradation temperature and hindering the extraction of the residual lignin.
- 2) This treatment also modified the internal structure of the lignocellulosic material, yielding a solid fraction with a more open and accessible structure. As a result, the water retention capacity of the solid fraction increased, and rose with the severity of the treatment. An increase in the volume of macropores was also observed, while the volume of mesopores decrease, increasing the accessibility but reducing the superficial area of the material. Consequently, the conditions of the treatment should be adjusted based on the nature of the process that the material is to be subjected to.
- 3) The chemical and structural changes caused by the steam explosion treatment, makes it a suitable pre-treatment for Kraft pulping. That way, this process could be transformed into a lignocellulosic biorefinery with a liquid fraction rich in hemicelluloses to be used for the production of bioethanol or other high value-added products.
- 4) The main components of the liquid fraction obtained in the steam explosion pre-treatment were xylooligosacharides, which can be used as a sugar source for bioethanol production. Enzymatic hydrolysis of this fraction provided better

yields than acid hydrolysis, allowing also for milder operational conditions that would not favor the generation of inhibiting compounds. The enzymatic yield achieved was 83%. To improve the hydrolysis and the subsequent fermentation yields, it would be of interest to study the detoxification of this liquid fraction by pre-treatments based on the laccase-mediator system.

- 5) The enzymatic hydrolysis of the solid fraction was also evaluated, considering the bioethanol production as an alternative to the pulp production. The hydrolysis yield was observed to increase with the severity of the pre-treatment and, also, when applying LMS before the enzymatic hydrolysis. However, it should be noted that a more severe pre-treatment would elicit degradation of the polysaccharides, reducing the recovery of xylooligosaccharides in the liquid fraction and increasing the generation of inhibiting products. Therefore, a mild pre-treatment, and detoxification with LMS treatments, would increase the overall sugar yield. However, the amount of sugar obtained from the solid fraction using the studied pre-treatments represents only 12.3% of the raw material. This finding and the high price of the Kraft pulp, makes Kraft pulping stand out as the best option to exploit the solid fraction, using only the liquid fraction for the production of bioethanol.
- 6) The open structure of the solid residue obtained after the steam explosion pre-treatment improved the diffusion of the reagents during a subsequent Kraft pulping, increasing the delignification by up to 70%. Alternatively, the cooking time was reduced from 60 to 25 minutes obtaining pulps with similar delignification grades, reducing the pulping energy consumption and increasing the productivity of a hypothetical mill. Nevertheless, the pulp yield of the process decreased from 50% to 40%. Although the pulp obtained required more energy during refining, the mechanical properties were only slightly worse.
- 7) The bleaching process was boosted by the pre-treatment, as a result of the reduction of the hexenuronic acid content in the unbleached pulps. When an enzymatic stage (LMS) was added to the bleaching sequence, the advantages of both the SE pre-treatment and the enzymatic treatment were combined, obtaining pulps with a lower kappa number, higher brightness and better

colorimetric properties than the control pulps. Furthermore, the hydrogen peroxide consumption was reduced by 20%.

- 8) Applying a LMS enzymatic stage between the steam explosion pre-treatment and the Kraft pulping was a viable alternative for conventional biopulping with ligninolytic fungi. The addition of this enzymatic stage increased the delignification by 13.9% with no detriment to the pulp yield and the mechanical properties of the pulps obtained, and reducing the chemical consumption. This process avoided some of the drawbacks of the industrial application of fungi, such as long treatment times, reducing it from weeks to hours, and yield loss due to polysaccharides degradation by the fungi.
- 9) The utilization of *Hesperaloe funifera* as raw material in the proposed biorefinery process could be a good alternative in areas with scant water and/or forest resources. In the steam explosion pre-treatment, 57% of the xylan present in the raw material was extracted. After the Kraft pulping, the unrefined pulps obtained showed similar properties to those of refined *E. globulus* pulps. The effect of the SE pre-treatment on pulping was less intense than that observed with *E. globulus*, whereas the effect on bleaching was similar with both raw materials. On the other hand, the addition of a LMS treatment between the SE pre-treatment and the Kraft pulping did not improve the delignification in the assayed conditions. However, the addition of LMS in the first stage of the bleaching sequence boosted the positive effect of the SE pre-treatment, with higher brightness and smaller kappa number and hydrogen peroxide consumption.



6

TRABAJOS FUTUROS

6. TRABAJOS FUTUROS

A partir de los resultados y conclusiones obtenidos en esta tesis doctoral se plantean varias líneas futuras de trabajo.

La primera de ellas sería ahondar en la recuperación de la corriente de hemicelulosas y su utilización en la producción de bioetanol. Para ello se propone estudiar la detoxificación de dicha corriente con tratamientos con LMS, antes y después de la hidrólisis enzimática, y estudiar su efecto en la fermentación. Para llevar a cabo esta fermentación se deberán utilizar bacterias o levaduras capaces de fermentar la xilosa a etanol, como *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* y *P. stipitis*. Además, se deberá optimizar la recogida de las hemicelulosas extraídas, para evitar las pérdidas observadas en los balances de materia del proceso realizados en la tesis doctoral.

La segunda línea importante que se propone estudiar en un futuro, es la recuperación de las lejías negras obtenidas en el pasteado. En este sentido se plantea estudiar el efecto de la extracción de hemicelulosas antes del proceso Kraft en el poder calorífico de las lejías negras y por tanto, en la energía que podría obtenerse a partir de ellas. Además, se propone estudiar el efecto del pre-tratamiento en el consumo de energía del proceso global, para estimar de este modo el balance total de energía y comprobar si el proceso continúa siendo autosuficiente energéticamente. Otro trabajo futuro en relación al aprovechamiento de las lejías negras, sería el estudio de la gasificación de las mismas.

La tercera línea de trabajo futuro sería la aplicación de los pre-tratamientos estudiados en la presente tesis doctoral en el pasteado mecánico. Tanto el pre-tratamiento de explosión por vapor como el tratamiento LMS antes del pasteado, se espera que contribuyan a reducir el consumo de energía durante el pasteado mecánico.

Por último, se propone ampliar el estudio de biopulpeo enzimático del *Hesperaloe funifera*. En la presente tesis, no se obtuvieron beneficios al aplicar un sistema LMS entre el pre-tratamiento de explosión por vapor y el pasteado Kraft, al contrario de lo observado con *Eucalyptus globulus*. Por ello, sería necesario ampliar el estudio de dicho tratamiento enzimático estudiando la influencia al menos de la dosis enzimática y del tiempo de tratamiento.



BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agenda-2020. 2010. Forest products industry technology roadmap. *American Forest & Paper Association*.
- Ahvazi, B., Radiotis, T., Bouchard, J. y Goel, K. 2007. Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 27(2), 49-63.
- Aitken, Y., Cadel, F. y Voillot, C. 1988. *Constituants fibreux des pâtes, papiers et cartons*. Centre Technique de l'Industrie des Papiers, Cartons et Cellulose y l'Ecole Française de Papeterie et des Industries Graphiques, Grenoble.
- Akhtar, M., Attridge, M. C., Myers, G. C. y Blanchette, R. A. 1993. Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. *Holzforschung*, 47(1), 36-40.
- Al-Dajani, W. W. y Tschirner, U. W. 2008. Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part I: alkaline extraction. *Tappi Journal*, 7(6), 3-8.
- Al-Dajani, W. W., Tschirner, U. W. y Jensen, T. 2009. Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping Part II: Acid-and autohydrolysis. *Tappi Journal*, 8(9), 30-37.
- Alaejos, J., Lopez, F., Eugenio, M. E. y Fernandez, M. 2004. Non-wood raw materials for pulp and paper making. A review. *Afinidad*, 61(513), 400-410.
- Alvira, P., Tomás Pejó, E., Negro, M. y Ballesteros, M. 2011. Strategies of xylanase supplementation for an efficient saccharification and cofermentation process from pretreated wheat straw. *Biotechnology Progress*, DOI: 10.1002/btpr.623.
- Aoyama, M., Seki, K. y Saito, N. 1995. Solubilization of bamboo grass xylan by steaming treatment. *Holzforschung*, 49(3), 193-196.
- ASPAPEL. 2011. <http://www.aspapel.es/es>. Último acceso en: Julio 2011
- Avellar, B. K. y Glasser, W. G. 1998. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 205-218.

- Babcock, L. W. 1932. Method of producing fermentable sugars and alcohol from wood, US Patent 1,855,464.
- Bajpai, P., Bajpai, P., Akhtar, M. y Jauhari, M. 2001. Biokraft pulping of eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. *Journal of pulp and paper science*, 27(7), 235-239.
- Balakshin, M., Capanema, E., Chen, C. L., Gratzl, J., Kirkman, A. y Gracz, H. 2001. Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system--reaction mechanisms for degradation of residual lignin. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 13(1-3), 1-16.
- Ballesteros, I., Negro, M. J., Oliva, J. M., Cabañas, A., Manzanares, P. y Ballesteros, M. 2006. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Applied biochemistry and biotechnology*, 130(1), 496-508.
- Barneto, A. G., Carmona, J. A., Alfonso, J. E. M. y Alcaide, L. J. 2009. Use of autocatalytic kinetics to obtain composition of lignocellulosic materials. *Bioresource technology*, 100(17), 3963-3973.
- Bidlack, J., Malone, M. y Benson, R. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science (USA)*.
- Blanchette, R. A., Burnes, T. A., Eerdmans, M. M. y Akhtar, M. 1992. Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. *Holzforschung*, 46(2), 109-116.
- Bourbonnais, R. y Paice, M. G. 1996. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi journal (USA)*.
- Britt, K. W. 1970. *Handbook of pulp and paper technology. 2nd Edition ed.* Van Nostrand Reinhold, New York.
- Burton, S. W. 2001. Low energy thermomechanical pulping process using an enzyme treatment between refining zones, US Patent 6,267,841.
- Burtscher, E., Bobleter, O., Schwald, W., Concin, R. y Binder, H. 1987. Chromatographic analysis of biomass reaction products produced by

- hydrothermolysis of poplar wood. *Journal of Chromatography A*, 390(2), 401-412.
- Cadena, E. M., Vidal, T. y Torres, A. L. 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Bioresource technology*, 101(10), 3554-3560.
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J. C., Gutiérrez, A., Gras, J. M., Monje, R., Martinez, M. J. y Martinez, A. T. 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and microbial technology*, 35(2-3), 113-120.
- Cañas, A. I. y Camarero, S. 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology advances*, 28(6), 694-705.
- Capanema, E. A., Balakshin, M. Y. y Kadla, J. F. 2004. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(7), 1850-1860.
- Capanema, E. A., Balakshin, M. Y. y Kadla, J. F. 2005. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(25), 9639-9649.
- Capanema, E. A., Balakshin, M. Y., Kadla, J. F. y Chang, H.-m. 2007. On isolation of milled wood lignin from eucalyptus wood. *O Papel(N5)*, 74-79.
- Carvalho, F., Duarte, L. C. y Gírio, F. M. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67, 849-864.
- Côte, W. 1977. Wood ultrastructure in relation to chemical composition. *Rec. Adv. Phytochem*, 11, 1-44.
- Chandel, A. K., Kapoor, R. K., Singh, A. y Kuhad, R. C. 2007. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource technology*, 98(10), 1947-1950.

- Chirat, C., Lachenal, D. y Dufresne, A. 2010. Biorefinery in a Kraft pulp mill: from bioethanol to cellulose nanocrystals. *Cellulose Chemistry and Technology*, 44(1-3), 59-64.
- Chua, M. y Wayman, M. 1979. Characterization of autohydrolysis aspen (P. tremuloides) lignins. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin. *Can. J. Chem*, 57, 1141-1149.
- Dahlman, O., Jacobs, A. y Sjöberg, J. 2003. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. *Cellulose*, 10(4), 325-334.
- Dekker, R. y Wallis, A. 1983. Autohydrolysis-explosion as pretreatment for the enzymic saccharification of sunflower seed hulls. *Biotechnology Letters*, 5(5), 311-316.
- Delong, E. A. 1981. Method of rendering lignin separable from cellulose and hemicellulose in lignocellulosic material and the product so produced, CA Patent CA1,096,374.
- Dias, A. A., Freitas, G. S., Marques, G. S. M., Sampaio, A., Fraga, I. S., Rodrigues, M. A. M., Evtuguin, D. V. y Bezerra, R. M. F. 2010. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresource Technology*, 101(15), 6045-6050.
- Donaldson, L., Wong, K. y Mackie, K. 1988. Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Science and Technology*, 22(2), 103-114.
- Donohoe, B. S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E. y Vinzant, T. B. 2008. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, 101(5), 913-925.
- Duff, S. J. B. y Murray, W. D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 55(1), 1-33.

- Dyer, T. y Ragauskas, A. 2004. Laccase: A harbinger to kraft pulping. En: "Lignocellulose Biodegradation" ACS Symposium Series. Ed.: Saha B.C y Hayashi K. Capitulo 20: 339-362.
- Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F. y Ramos, L. P. 2003. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresource Technology*, 86(2), 105-115.
- Eriksson, J., Malmsten, M., Tiberg, F., Callisen, T. H., Damhus, T. y Johansen, K. S. 2005. Enzymatic degradation of model cellulose films. *Journal of colloid and interface science*, 284(1), 99-106.
- Eugenio, M., Santos, S., Carbajo, J., Martín, J., Martín-Sampedro, R., González, A. y Villar, J. 2010a. Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource technology*, 101(6), 1866-1870.
- Eugenio, M. E., Miranda, J., Martín-Sampedro, R. y Villar, J. C. 2010b. Influence of laccase bleaching process variables on bleached pulps properties. Proceeding of VI Iberoamerican congress on pulp and paper research (CIADICYP), Lisboa, Portugal. pp. 160-161.
- Evans, C. y Betts, W. 1991. Enzymes of lignin degradation. *Biodegradation: natural and synthetic materials.*, 175-184.
- Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Silva, A. M. S., Domingues, P. M., Amado, F. M. L., Robert, D. y Faix, O. 2001. Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* wood. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4252-4261.
- Excoffier, G., Peguy, A., Rinaudo, M. y Vignon, M. 1991. Evolution of lignocellulosic components during steam explosion. Potential applications. Proceeding of *International workshop of steam explosion techniques: Fundamentals and industrial applications*. Routledge. pp. 83-95.
- Fairbank, M. y Detrick, R. 2000. *Hesperaloe funifera*-an excellent reinforcement fiber for mechanical paper grades. *Tappi Journal*, 83(11).

- FAO. 2011. Food and Agricultural Organization. <http://faostat.fao.org>. Último acceso en: May 2011
- Faulon, J. L., Carlson, G. A. y Hatcher, P. G. 1994. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. *Organic geochemistry*, 21(12), 1169-1179.
- Fengel, D. y Wegener, G. 1989. Wood–Chemistry. *Ultrastructure Reactions*, New York, 183.
- Ferraz, A., Guerra, A., Mendonça, R., Masarin, F., Vicentim, M. P., Aguiar, A. y Pavan, P. C. 2008. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 178-185.
- Fillat, A., Colom, J. F. y Vidal, T. 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresource technology*, 101(11), 4104-4110.
- Focher, B. y Marzetti, A. 1991. *Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications*. Gordon and Breach Publishers, Philadelphia.
- García-Aparicio, M. A. P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J. M., Ballesteros, M. y Negro, M. A. J. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 129-132, 278-288.
- Garrote, G., Dominguez, H. y Parajó, J. C. 2001. Generation of xylose solutions from *Eucalyptus globulus* wood by autohydrolysis-posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics. *Bioresource Technology*, 79(2), 155-164.
- Gellerstedt, G. y Lindfors, E. L. 1984. Structural changes in lignin during kraft pulping. *Holzforschung*, 38(3), 151-158.
- Glasser, W. G. y Wright, R. S. 1998. Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 219-235.
- Grethlein, H. E. 1985. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nature Biotechnology*, 3(2), 155-160.

- Gutiérrez, A., Rencoret, J., Ibarra, D., Molina, S., Camarero, S., Romero, J., José, C. y Martínez, Á. T. 2007. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environmental science & technology*, 41(11), 4124-4129.
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I. y Gorwa-Grauslund, M. F. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(5), 937-953.
- Hayn, M., Steiner, W., Klinger, R., Steinmüller, H., Sinner, M. y Esterbauer, H. 1993. Basic research and pilot studies on the enzymatic conversion of lignocellulosic. in: *Bioconversion of forest and agricultural plant residues*, (Ed.) Saddler, J. N., CAB International. Wallingford, UK.
- Heitner, C., Argyropoulos, D. S., Miles, K. D., Karnis, A. y Kerr, R. D. 1993. Alkaline sulphite ultra-yield pulping of Aspen chips – A comparison of steam-explosion and conventional chemimechanical pulping. *Journal of Pulp & Paper Science*, 19(2), 58-70.
- Heitz, M., Capek-Menard, E., Koeberle, P., Gagne, J. y Chornet, R. 1991. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Bioresource technology*, 35(1), 23-32.
- Heitz, M., Wu, G., Lapointe, J. y Rubio, M. 1995. Hydrolytic depolymerization of a steam explosion lignin. *Journal of wood chemistry and technology*, 15(4), 515-528.
- Helmerius, J., von Walter, J. V., Rova, U., Berglund, K. A. y Hodge, D. B. 2010. Impact of hemicellulose pre-extraction for bioconversion on birch Kraft pulp properties. *Bioresource Technology*, 101(15), 5996-6005.
- Henriksson, G., Brännvall, E. y Lennholm, H. 2007. The trees. in: *Wood chemistry and wood biotechnology*, (Ed.) Fiber and polymer technology, K. Stockholm.
- Henriksson, G. y Teeri, T. 2007. Biotechnology in the forest industry. in: *Wood chemistry and wood biotechnology*, (Ed.) Fiber and Polymer Technology, K. Stockholm.

- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry: biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*, 24(1), 23-63.
- Howard, R., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. y Howard, S. 2003. Review- Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2, 12.
- Huang, H. J., Ramaswamy, S., Al-Dajani, W. W. y Tschirner, U. 2010. Process modeling and analysis of pulp mill-based integrated biorefinery with hemicellulose pre-extraction for ethanol production: A comparative study. *Bioresource Technology*, 101(2), 624-631.
- Ibarra, D., Camarero, S., Romero, J., Martínez, M. J. y Martínez, A. T. 2006. Integrating laccase-mediator treatment into an industrial type sequence for totally chlorine free bleaching of eucalypt kraft pulp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7), 1159-1165.
- Ibarra, D., Chávez, M. I., Rencoret, J., Suárez, G., Sánchez, R., Camarero, S., Hernández, M., Jesús, M., Jiménez-Barbero, J. y Ferrer, M. 2007. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine free bleaching sequence including a laccase-mediator stage.
- Iiyama, K., Lam, T. B. T. y Stone, B. A. 1990. Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes. *Phytochemistry*, 29(3), 733-737.
- Islam, M. N., Karim, M. R. y Malinen, R. O. 2008. Beneficial effects of fungal treatment before pulping and bleaching of *Acacia mangium* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 32, 331-338.
- Jacobs-Young, C., Heitmann, J. y Venditti, R. 1998. Conventional Kraft pulping using enzyme pretreatment technology: role of chip thickness, specie and enzyme combinations. in: *Innovative Advances in the Forest Products Industries*, American Institute of Chemical Engineers, pp. 1-15.
- Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P. y Sundquist, J. 1995. Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforschung*, 49(1), 51-59.

- Josefsson, P., Henriksson, G. y Wågberg, L. 2007. The physical action of cellulases revealed by a quartz crystal microbalance study using ultrathin cellulose films and pure cellulases. *Biomacromolecules*, 9(1), 249-254.
- Josefsson, T., Lennholm, H. y Gellerstedt, G. 2001. Changes in cellulose supramolecular structure and molecular weight distribution during steam explosion of aspen wood. *Cellulose*, 8(4), 289-296.
- Josefsson, T., Lennholm, H. y Gellerstedt, G. 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterisation of reaction products. *Holzforschung*, 56(3), 289-297.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, Á., Martínez, A. T. y Martínez, M. J. 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresource technology*, 100(24), 6378-6384.
- Kamm, B. y Kamm, M. 2007. Biorefineries—multi product processes. *White Biotechnology*, 175-204.
- Kantelinen, A., Hortling, B., Sundquist, J., Linko, M. y Viikari, L. 1993. Proposed mechanism of the enzymatic bleaching of kraft pulp with xylanases. *Holzforschung*, 47(4), 318-324.
- Karlsson, H. 2006. *Fiber Guide. Fiber analysis and process applications in the pulp and paper industry*. Elanders Tofters AB, Stockholm, Sweden.
- Kishimoto, T. y Nakatsubo, F. 1998. Non-chlorine bleaching of kraft pulp. V. Participation of radical species in ozonation of methyl 4-O-ethyl- -D-glucopyranoside. *Holzforschung*, 52(2), 185-190.
- Kokta, B. y Ahmed, A. 1998. Steam explosion pulping. in: *Environmentally friendly technologies for the Pulp and Paper Industry*, (Eds.) Young, R. A. y Akhtar, M., J. Wiley. New York.
- Lam, T., Kadoya, K. y Iiyama, K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the [beta]-position, in grass cell walls. *Phytochemistry*, 57(6), 987-992.
- Leschinsky, M., Sixta, H. y Patt, R. 2009. Detailed mass balances of the autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* at 170 degrees C. *Bioresources*, 4(2), 687-703.

- Li, H., Saeed, A., Jahan, M. S., Ni, Y. y van Heiningen, A. 2010. Hemicellulose removal from hardwood chips in the pre-hydrolysis step of the kraft-based dissolving pulp production process. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(1), 48-60.
- Li, J., Henriksson, G. y Gellerstedt, G. 2005. Carbohydrate reactions during high-temperature steam treatment of aspen wood. *Applied biochemistry and biotechnology*, 125(3), 175-188.
- Li, J., Henriksson, G. y Gellerstedt, G. 2007. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresource technology*, 98(16), 3061-3068.
- Lindgren, C. y Lindström, M. E. 1996. The kinetics of residual delignification and factors affecting the amount of residual lignin during kraft pulping. *Journal of pulp and paper science*, 22(8), J290-J295.
- Maijala, P., Kleen, M., Westin, C., Poppius-Levlin, K., Herranen, K., Lehto, J., Reponen, P., Mäentausta, O., Mettälä, A. y Hatakka, A. 2008. Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 169-177.
- Malmstrom, B. G. 1982. Enzymology of oxygen. *Annual review of biochemistry*, 51(1), 21-59.
- Maloney, M. T., Chapman, T. W. y Baker, A. J. 1985. Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetics studies of xylan and acetyl group hydrolysis. *Biotechnology and bioengineering*, 27(3), 355-361.
- Mamers, H. y Rowney, J. E. 1979. Method and apparatus for explosively defibrating cellulosic fiber, US Patent 4,163,687.
- Mamers, H., Yuritta, J. y Menz, D. 1981. Explosion pulping of bagasse and wheat straw. *Tappi Journal*, 64(7).
- Mao, H. B., Genco, J. M., van Heiningen, A. y Pendse, H. 2010. Kraft mill biorefinery to produce acetic acid and ethanol: Technical economic analysis. *Bioresources*, 5(2), 525-544.

- Marinova, M., Mateos-Espejel, E., Jemaa, N. y Paris, J. 2009. Addressing the increased energy demand of a Kraft mill biorefinery: The hemicellulose extraction case. *Chemical Engineering Research and Design*, 87(9), 1269-1275.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B. y Jönsson, L. J. 2002. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and microbial technology*, 31(3), 274-282.
- Martinez, J., Granado, J., Montane, D., Salvado, J. y Farriol, X. 1995. Fractionation of residual lignocellulosics by dilute-acid prehydrolysis and alkaline extraction: Application to almond shells. *Bioresource Technology*, 52(1), 59-67.
- Mason, W. H. 1926. Process and apparatus for disintegration of wood and the like, US Patent 1,578,609.
- McLaughlin, S. P. 2000. Properties of paper made from fibers of *Hesperaloe funifera* (Agavaceae). *Economic Botany*, 54(2), 192-196.
- McLaughlin, S. P. y Schuck, S. M. 1991. Fiber properties of several species of Agavaceae from the southwestern United States and northern Mexico. *Economic Botany*, 45(4), 480-486.
- Mendes, C. V. T., Carvalho, M., Baptista, C., Rocha, J. M. S., Soares, B. I. G. y Sousa, G. D. A. 2009. Valorisation of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept. *Food and Bioproducts Processing*, 87(C3), 197-207.
- Mendonça, R. T., Jara, J. F., González, V., Elissetche, J. P. y Freer, J. 2008. Evaluation of the white-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispora* in biotechnological applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1323-1330.
- Messner, K. y Srebotnik, E. 1994. Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS microbiology reviews*, 13(2-3), 351-364.

- Moldes, D., Cadena, E. y Vidal, T. 2010. Biobleaching of eucalypt kraft pulp with a two laccase-mediator stages sequence. *Bioresource technology*, 101(18), 6924-6929.
- Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T. y Vidal, T. 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresource technology*, 99(17), 7959-7965.
- Montane, D., Salvado, J., Farriol, X., Jollez, P. y Chornet, E. 1994. Phenomenological kinetics of wood delignification: application of a time-dependent rate constant and a generalized severity parameter to pulping and correlation of pulp properties. *Wood Science and Technology*, 28(6), 387-402.
- NREL. 2011. National Renewable Energy Laboratory. <https://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>. Último acceso en: July 2011
- Ohgren, K., Rudolf, A., Galbe, M. y Zacchi, G. 2006. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy*, 30(10), 863-869.
- Oliva, J. M., Sáez, F., Ballesteros, I., González, A., Negro, M. J., Manzanares, P. y Ballesteros, M. 2003. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 105(1), 141-153.
- Oriaran, T. P., Labosky Jr, P. y Blankenhorn, P. R. 1990. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium*-degraded aspen. *Tappi Journal*, 73(7), 147-152.
- Oudia, A., Queiroz, J. y Simões, R. 2008. Potential and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 144-148.
- Overend, R. y Chornet, E. 1987. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments. *Philosophical transactions of the royal society of London, series A*, 321(1561), 523-536.

- Paice, M., Bernier Jr, R. y Jurasek, L. 1988. Viscosity enhancing bleaching of hardwood kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnology and bioengineering*, 32(2), 235-239.
- Palmqvist, E. y Hahn-Hägerdal, B. 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource technology*, 74(1), 17-24.
- Palmqvist, E. y Hahn-Hägerdal, B. 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource technology*, 74(1), 25-33.
- Palonen, H. y Viikari, L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnology and bioengineering*, 86(5), 550-557.
- Peraza, C., Guindeo, A., Garcia, L. y Lain, L. 1993. *Tecnología de la madera I*. Fundación Conde del Valle de Salazar. Universidad Politécnica de Madrid, Madrid.
- Pere, J., Ellmén, J. y Viikari, L. 2005. Process for preparing mechanical pulp, WO Patent WO/2005/056,915.
- Pérez, J., Ballesteros, I., Ballesteros, M., Sáez, F., Negro, M. y Manzanares, P. 2008. Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel*, 87(17-18), 3640-3647.
- Petit-Conil, M., Semar, S., Niku-Paavola, M. L., Sigoillot, J., Asther, M., Anke, H. y Viikari, L. 2002. Potential of laccases in softwood-hardwood high-yield pulping and bleaching. *Progress in Biotechnology*, 21, 193-201.
- Quesada, J., Rubio, M. y Gómez, D. 1998. Direct action of molecular ozone against lignin and its standard compounds. *Afinidad*, 55(478), 413-421.
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C. A., Hallett, J. P. y Liotta, C. L. 2006. From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. *Industrial Biotechnology*, 2(1), 55-65.
- Ragauskas, A. J., Poll, K. M. y Cesternino, A. J. 1994. Effects of xylanase pretreatment procedures on nonchlorine bleaching. *Enzyme and microbial technology*, 16(6), 492-495.

- Ragnar, M. 2001. On the importance of the structural composition of pulp for the selectivity of ozone and chlorine dioxide bleaching. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 16(1), 72-79.
- Ramos, J., Rojas, T., Navarro, F., Dávalos, F., Sanjuán, R., Rutiaga, J. y Young, R. A. 2004. Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(16), 5057-5062.
- Ramos, L., Breuil, C., Kushner, D. y Saddler, J. 1992. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung*, 46(2), 149-154.
- Renneckar, S., Johnson, R., Zink-Sharp, A., Sun, N. y Glasser, W. 2005. Fiber modification by steam-explosion: ¹³C NMR and dynamic mechanical analysis studies of co-refined wood and polypropylene. *Composite Interfaces*, 12(6), 559-580.
- Robert, D., Bardet, M., Lapierre, D. y Gellerstedt, G. 1988. Structural changes in aspen lignin during steam explosion treatment. *Cellulose Chemistry and Technology*, 22, 221-230.
- Robert, D., Gellerstedt, G. y Bardet, M. 1986. Carbon-13 NMR analysis of lignins obtained after sulfonation of steam exploded aspen wood [prehydrolysis, structural analysis]. *Nordic Pulp and Paper Research Journal (Sweden)*.
- Romero, A., Garcia-Ochoa, F. y Caperos, A. 1992. Modeling resin extraction from wood with different solvents. *Tappi Journal*, 75(8), 141-145.
- Roncero, M. B., Torres, A. L., Colom, J. F. y Vidal, T. 2003. Effect of xylanase on ozone bleaching kinetics and properties of Eucalyptus kraft pulp. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(10), 1023-1031.
- Rovira, P. y Vallejo, V. R. 2000. Examination of thermal and acid hydrolysis procedures in characterization of soil organic matter. *Communications in soil science and plant analysis*, 31(1), 81-100.

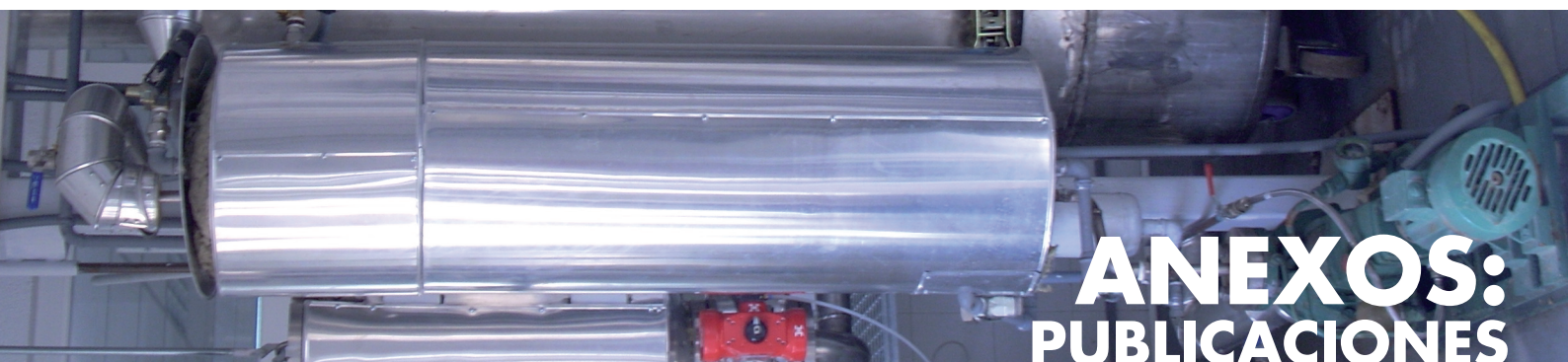
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M. y Castro, E. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), 160-166.
- San Martin, R., Perez, C. y Briones, R. 1995. Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. *Bioresource technology*, 53(3), 217-223.
- Sánchez, R., Rodríguez, A., García, J., Rosal, A. y Jiménez, L. 2011. Exploitation of hemicellulose, cellulose and lignin from *Hesperaloe funifera*. *Bioresource technology*, 102, 1308-1315.
- Sanchez, R., Rodriguez, A., Navarro, E., Conesa, J. y Jimenez, L. 2010. Use of *Hesperaloe funifera* for the production of paper and extraction of lignin for synthesis and fuel gases. *Biomass and Bioenergy*, 34(10), 1471-1480.
- Schild, G., Sixta, H. y Testova, L. 2010. Multifunctional alkaline pulping, delignification and hemicellulose extraction. *Cellulose Chemistry and Technology*, 44(1-3), 35-45.
- Schultz, T. P., Biermann, C. J. y McGinnis, G. D. 1983. Steam explosion of mixed hardwood chips as a biomass pretreatment. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 22(2), 344-348.
- Selig, M. J., Viamajala, S., Decker, S. R., Tucker, M. P., Himmel, M. E. y Vinzant, T. B. 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Progress*, 23(6), 1333-1339.
- Senior, D. y Hamilton, J. 1992. Use of xylanases to decrease the formation of AOX in kraft pulp bleaching. *Journal of pulp and paper science*, 18(5), J165-J169.
- Sevastyanova, O., Lindstrom, M. y Gellerstedt, G. 2005. Influence of a Bleaching Sequence on the Brightness Stability of Eucalyptus Kraft Pulp. Proceeding of. Appita Inc. pp. 251.
- Shah, A., Cooper, D., Adolphson, R. y Eriksson, K. E. L. 2000. Xylanase treatment of oxygen-bleached hardwood kraft pulp at high temperature and alkaline pH levels

- gives substantial savings in bleaching chemicals. *Journal of pulp and paper science*, 26(1), 8-11.
- Shimizu, K., Sudo, K., Ono, H., Ishihara, M., Fujii, T. y Hishiyama, S. 1998. Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, 14(3), 195-203.
- Sigoillot, C., Camarero, S., Vidal, T., Record, E., Asther, M., Pérez-Boada, M., Martinez, M. J., Sigoillot, J. C. y Colom, J. F. 2005. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of biotechnology*, 115(4), 333-343.
- Suurnäkki, A., Heijnesson, A., Buchert, J., Viikari, L. y Westermarck, U. 1996. Chemical characterization of the surface layers of unbleached pine and birch kraft pulp fibres. *Journal of pulp and paper science*, 22(2), J43-J47.
- Teeri, T. y Henriksson, G. 2007. Enzymes degrading wood componets. in: *Wood chemistry and wood biotechnology*, (Ed.) Fiber and polimer technology, K. Stockholm.
- Tenkanen, M., Buchert, J. y Viikari, L. 1995. Binding of hemicellulases on isolated polysaccharide substrates. *Enzyme and microbial technology*, 17(6), 499-505.
- Tomás-Pejó, E. 2010. Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso, Vol. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- Tunc, M. S., Lawoko, M. y van Heiningen, A. 2010. Understanding the limitations of removal of hemicelluloses during autohydrolysis of a mixture of southern hardwood. *Bioresources*, 5(1), 356-371.
- Turi, E. A. 1981. Thermal characterization of polymeric materials, Academic Press. New York.
- Um, B. H. y van Walsum, G. P. 2009. Acid hydrolysis of hemicellulose in green liquor pre-pulping extract of mixed northern hardwoods. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 153(1), 127-138.

- Um, B. H. y van Walsum, G. P. 2010. Evaluation of enzyme mixtures in releasing fermentable sugars from pre-pulping extracts of mixed northeast hardwoods. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 161(1), 432-447.
- Valls, C. y Roncero, B. 2009. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresource technology*, 100(6), 2032-2039.
- Valls, C., Vidal, T. y Roncero, M. B. 2010. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochemistry*, 45(3), 425-430.
- Van Heiningen, A. 2006. Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. *Pulp and Paper Canada*, 107(6), 38-43.
- Varga, E., Réczey, K. y Zacchi, G. 2004. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Applied biochemistry and biotechnology*, 114(1), 509-523.
- Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J. y Linko, M. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 335-350.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Sundquist, J. y Linko, M. 1986. Bleaching with enzymes. *Proceeding of Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. pp. 67-69.
- Vila, C., Romero, J., Francisco, J. L., Garrote, G. y Parajo, J. C. 2011. Extracting value from Eucalyptus wood before kraft pulping: Effects of hemicelluloses solubilization on pulp properties. *Bioresource Technology*, 102(8), 5251-5254.
- Vision-2030. 2006. A strategic research Agenda for Innovation, Competitiveness and Quality of Life. *Forest Based Sector Technology Platform*.
- Vivekanand, V., Dwivedi, P., Sharma, A., Sabharwal, N. y Singh, R. 2008. Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(12), 2799-2804.
- Vuorinen, T., Fagerström, P., Buchert, J., Tenkanen, M. y Teleman, A. 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Journal of pulp and paper science*, 25(5), 155-162.

- Wan, C. X. y Li, Y. B. 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and microbial technology*, 47(1-2), 31-36.
- Widsten, P. y Kandelbauer, A. 2008. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and microbial technology*, 42(4), 293-307.
- Wiselogle, A., Tyson, S. y Johnson, D. 1996. Biomass feedstock resources and composition. in: *Handbook on bioethanol: production and utilization*, (Ed.) Francis, T. a., CRC. Bristol.
- Wolfaardt, F., Taljaard, J., Jacobs, A., Male, J. y Rabie, C. 2004. Assessment of wood-inhabiting basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. *Bioresource technology*, 95(1), 25-30.
- Wong, A. y McLaughlin, S. 2000. Alkaline sulphite pulping of Hesperaloe, an arid-zone native fiber plant from northern Mexico. *Proceeding of*. pp. 6-9.
- Wong, K. 1997a. Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 1: Process parameters. *Appita journal*, 50(5), 415-422.
- Wong, K. 1997b. Mechanisms of xylanase aided bleaching of kraft pulp. Part 2: Target substrates. *Appita journal*, 50(6), 509-518.
- Wright, L., Boundy, B., Perlack, B., Davis, S. y Saulsbury, B. 2006. *Biomass Energy Data Book*. U.S. Department of Energy (DOE), Oak Ridge, TN.
- Wu, M. M., Chang, K., Gregg, D. J., Boussaid, A., Beatson, R. P. y Saddler, J. N. 1999. Optimization of steam explosion to enhance hemicellulose recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. *Applied Biochemistry and biotechnology*, 77(1), 47-54.
- Yang, B. y Wyman, C. E. 2004. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnology and bioengineering*, 86(1), 88-98.
- Zhang, X., Renaud, S. y Paice, M. 2005. The potential of laccase to remove extractives present in pulp and white water from TMP newsprint mills. *Journal of pulp and paper science*, 31(4), 175-180.

Zhao, J., Li, X., Qu, Y. y Gao, P. 2002. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat straw. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 734-740.



ANEXOS:
PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN I:

Steam explosion treatment of *Eucalyptus globulus* wood: Influence of operational conditions on chemical and structural modifications.

Martín-Sampedro, R., Martín, J.A., Eugenio, M.E., Revilla, E., Villar, J.C.

BioResources. 2011. 6(4): 4922-4935.

STEAM EXPLOSION TREATMENT OF *EUCALYPTUS GLOBULUS* WOOD: INFLUENCE OF OPERATIONAL CONDITIONS ON CHEMICAL AND STRUCTURAL MODIFICATIONS

Raquel Martín-Sampedro, Juan Antonio Martín, Maria E. Eugenio, Esteban Revilla, and Juan Carlos Villar*

This study evaluates the use of steam explosion (SE) as a pre-treatment of *Eucalyptus globulus* chips, aimed at making this wood suitable as feedstock in biorefineries or alternative processes such as biopulping. Several SE treatments were applied, modifying the following variables: previous hydration of the chips, number of SE cycles, and duration of the first cycle. Chemical composition and structural properties were analyzed after all treatments. Our results show that acetone and hot water extractives contents increased between 1.0% and 6.2% and between 3.6% and 7.1%, respectively, depending on SE operational conditions. Holocellulose content was also observed to decrease (9.4 to 15.6%), while the Klason lignin underwent a slight solubilization. Furthermore, greater water retention capacity and new bigger sized pores were found in the exploded samples. It is reasonable to expect that these changes would facilitate the subsequent implementation of chemical or biological treatments of the cellulose fraction in the biorefinery design.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; Biorefinery; Steam explosion; Porosity

Contact information: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA. Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040, Madrid (Spain); * Corresponding author: villar@inia.es

INTRODUCTION

Extensive research efforts to improve the processing and digestion of biomass for several applications have been pursued in the last few years. Steam explosion (SE) is one of the most widely used treatments for fractionation of lignocellulosic components. It is defined as a process by which the lignocellulosic material is exposed to high pressure steam before it undergoes very rapid decompression. This sudden decompression leads to an “explosion” of the steam inside the lignocellulosic matrix, which promotes breakdown and defibrillation of its structure, hydrolysis of the hemicelluloses, and depolymerisation/repolymerization of the lignin (Ruiz et al. 2008). Thus, the accessibility of the material to chemical or enzymatic degradation is greatly increased (Moniruzzaman 1996; Martín-Sampedro et al. 2011). The advantages of SE include a significantly lower environmental impact, low capital investment, and fewer hazardous chemicals applied in the process compared to other methods for hemicelluloses extraction (Li et al. 2001). On the other hand, the presence of degradation products from sugar and lignin is unavoidable and must be taken into account in order to minimize the potential inhibitory effect on subsequent steps such as the enzymatic hydrolysis (Tengborg et al. 2001).

The use of SE in wood processing has increased considerably in the last years due to its potential to produce chemical and structural changes in the lignocellulosic material (Ruiz et al. 2008; Viola et al. 2008; Sun and Chen 2008; Cara et al. 2008). This potential means that SE can be exploited in a way that opens new opportunities in several industrial, energetic, and environmental fields. For instance, this technology has been considered an alternative to conventional chemi-mechanical (CMP) and chemi-thermo-mechanical pulping (CTMP) (Ahvazi et al. 2007). The SE softens lignin, which favours a more intense defibrillation. However, SE pulping has not been industrially implemented yet, because the steam exploded pulps have failed so far to show any superior properties over those from CMP or CTMP (Heitner et al. 1993). Other authors have used SE as a pre-treatment in chemical pulping, and have suggested that, because it facilitates a more efficient diffusion of cooking liquor into the chips, the open structure of the exploded chips might lead to a higher yield and lower rejects in kraft pulping (Ahvazi et al. 2007; Martín-Sampedro et al. 2011a). SE has also been applied to improve delignification during the laccase treatment prior to kraft pulping or in biobleaching sequences (Martín-Sampedro et al. 2011b,c).

Similarly, a considerable research effort is being applied to develop new strategies designed to find renewable bio-fuels extracted from the biomass. The biomass types considered for ethanol production include lignocellulosic material such as wood, annual crops, and agricultural and forestry residues. It has been widely recognized that the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates are influenced not only by the effectiveness of the enzymes but also by the chemical, physical, and morphological characteristics of the substrates (Chandra et al. 2007). Thus, a pre-treatment of the lignocellulosic material is required to improve all these aspects. SE is suitable for this end because it is known to induce autohydrolysis and defibrillation. Therefore, several authors have reported on the use of SE in bioethanol production as pre-treatment of different biomass sources, such as sunflower stalks (Ruiz et al. 2008), wheat straw (Sun and Chen 2008), olive tree pruning (Cara et al. 2008), soybean hulls (Corredor et al. 2008), logdepole pine (Cara et al. 2008), or eel grass (*Zostera marina*) (Viola et al. 2008).

For all the reasons above mentioned, the SE pre-treatment of lignocellulose appears to be an excellent tool for improving the production of the two main cellulose derivatives: pulp and ethanol. Consequently the aim of this study was to assess the effect of the SE pre-treatment on the chemical and structural modifications of *Eucalyptus globulus* chips. To achieve that goal the chemical composition, water retention capacity, relative porosity, and relative surface of the material were determined.

EXPERIMENTAL

Raw Material

E. globulus chips were kindly supplied by La Montañanesa pulp mill (Spain). The material was air dried until reaching constant moisture, and then homogenized in a single stock (by conditioning inside polyethylene bags) to avoid differences in composition and water content. The chips were stored in polyethylene bags at 25° C.

Steam Explosion Treatment

The SE treatment was performed in a 26 litre stainless steel digester capable of reaching a temperature of 190 °C and a pressure of 1.37 MPa (14 kg cm⁻²). The digester was equipped with a tubular heat exchanger, electrovalves for steam admission, and a ball valve of discharge. The steam generator was a Babcock Wanson VAP 250RR boiler (Erando, Spain), with a maximum steam production of 270 kg h⁻¹ and a working pressure of 1.37 MPa. A sketch of the digester is shown in Fig. 1.

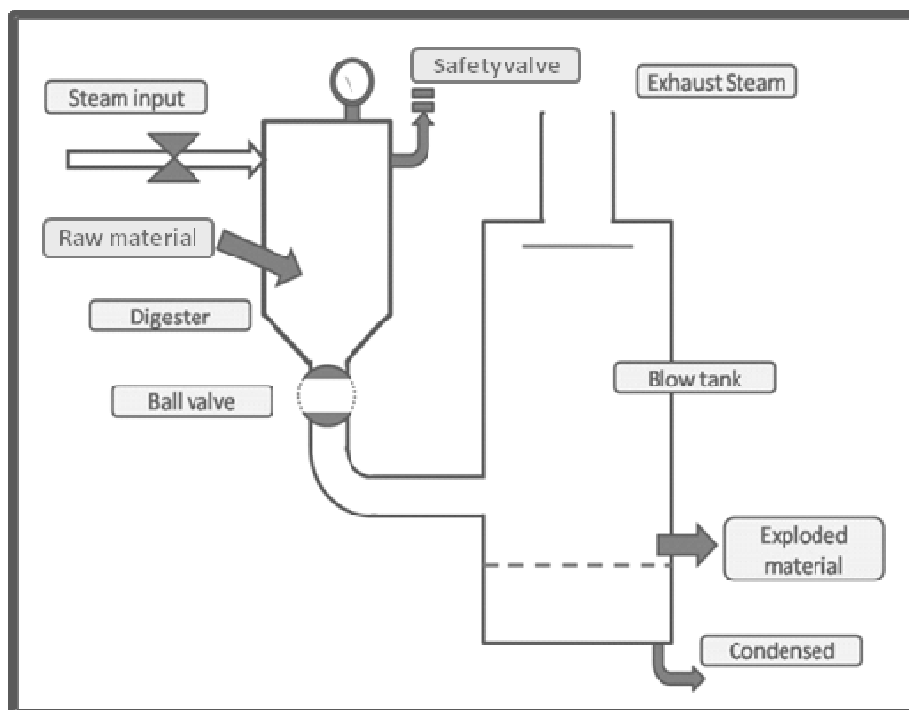


Fig. 1. Sketch of the digester used in the SE experiments

The SE conditions assayed were: number of cycles of treatment (once or twice), duration of the first cycle (5 or 10 minutes), and presence or absence of pre-hydration (presence: immersion in water for 16 hours at 25° C; absence: no previous immersion in water). This last variable was studied in order to evaluate the effect of the uniformity of impregnation on the subsequent steam explosion treatment.

The experimental design was as follows: the raw material was divided into ten samples of 500 g, which were used in eight experiments (2³) and two controls, corresponding to hydrated and non-hydrated samples. Common operational conditions to all treatments were: temperature of operation, 183 °C; treatment pressure, 0.98 MPa (10 kg cm⁻²); discharge pressure, 0.59 MPa (6 kg cm⁻²); and duration of the second cycle, 3 minutes. All the specific variable values for the two controls and all the treated samples are listed in Table 1. Chips were introduced into the digester, and operational conditions were reached and maintained by charging steam. At the end of the steam treatment (after 5 or 10 minutes, according to Table 1), the pressure was reduced to 0.59 MPa (for security reasons), and then the chips were suddenly discharged into the blowing tank at

atmospheric pressure. When a second cycle was carried out, the exploded chips obtained in the first cycle were washed with cold water and then subjected to a second cycle following the same procedure. After treatment, the samples were thoroughly washed with water, dried at room temperature and stored in sealed polyethylene bags.

Table 1. Variable Values for Each Control and SE Treated Sample

Sample	Previous hydration	Number of cycles of treatment	Duration the first cycle
C1	No	-	-
C2	Yes	-	-
NH-5	No	1	5
H-5	Yes	1	5
NH-10	No	1	10
H-10	Yes	1	10
NH-5+3	No	2	5
H-5+3	Yes	2	5
NH-10+3	No	2	10
H-10+3	Yes	2	10

Chemical Analysis

In order to carry out the chemical analysis, all the samples were dried at room temperature and then milled in a Wiley mill. The samples were sieved using standard sieves to obtain 20 g of wood meal sized between 0.30 and 0.40 mm. Acetone extractives (UNE-EN ISO 14453), hot water extractives (UNE 57-013-82), lignin content (TAPPI T 222 om-88), and holocellulose content (Wise et al. 1946) were then measured on the wood meal. All determinations were duplicated.

The concentrations of furfural and hydroxymethyl furfural (HMF) in the liquid fractions obtained during the experiments were also determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using the Agilent Technology 1200 series RID (Las Rozas, Spain) with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Alcobendas, Spain). The equipment was operated at 50 °C with a mobile phase containing 5 mM sulfuric acid pumped at a rate of 0.6 mL min⁻¹.

Water Retention Capacity

The water retention, or hydration capacity of the treated and untreated chips was defined as the weight of water absorbed by the chips after being immersed in water at 25 °C for 6 hours (Martín-Sampedro et al. 2011a). It was expressed as grams of water per 100 grams of oven-dry wood.

Porosity and Surface Analysis

The relative pore volume and the relative surface of the samples were determined by mercury intrusion porosimetry (MIP) using a CEI instrument, Pascal 140 / 240 porosimeter, equipped with the Software version 1.03B-2. The samples were dried at 60 °C overnight. IUPAC (Rouquerol et al. 1994) values for mercury contact angle (141°), Hg surface tension (484 m N m⁻¹), Hg density (13.534 g mL⁻¹), and Hg temperature (25°C) were used for these measurements. A cylindrical model of the pores was used in the assays.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Analysis

The SE had a clear effect on the chemical composition of the treated chips. Figures 2a and 2b show the acetone and hot water extractives. As can be observed in Fig. 2a, there was a clear increase in the percentage of acetone extractives in all the exploded samples. This increase could be partly associated with the degradation of lignin caused by the treatments (Chandra et al. 2007). Longer times of treatment resulted in higher extractive percentages (increase of 1.3-3.1% and 2.4-6.2% for 5-10 min of treatment, for hydrated and non-hydrated samples, respectively), but when a second SE cycle was added, similar or even lower percentages of acetone extractives were found (increase of 1.0-4.5% and 3.2-4.2% for 5-10 min of treatment, for hydrated and non-hydrated samples respectively). This is likely to be caused by the removal effect of the second cycle. The pre-hydration of chips did not always show a meaningful effect but seemed to be more relevant during the first cycle with long times of treatment.

As Fig. 2b reveals, SE also increased the percentage of hot water extractives in all the treated samples, with differences of 3.6% to 7.1%. The increase seemed to be independent of the treatment duration, number of cycles, and previous hydration, which suggests that a threshold severity value, causing the maximum formation of water soluble compounds, was reached even with the mildest treatment.

There was a significant decrease in the holocellulose content after every treatment (Fig. 2c). The relative value was reduced from the 74-77% (controls) down to 61-65%, regardless of the SE conditions. A similar reduction of holocellulose content took place in all the treated samples, which could indicate that the severity of the treatments was enough to reach a constant degree of holocellulose degradation, causing an increase in hot water extractives, as already described. However, if steam explosion yield is taken into account, it is possible to determine the percentage of the original holocellulose that remains in the solid after treatment, and therefore, estimate the real holocellulose degradation. Table 2 shows the treatment yields and the percentages of holocellulose and Klason lignin that remain in the solid fraction after each steam explosion treatment, compared to the original amount in the raw material (C1). As can be observed, the percentage of holocellulose underwent a progressive reduction (due to hemicelluloses solubilization) when the severity of the treatment increased (longer treatment and/or addition of a second SE cycle). The pre-hydration of the chips, also contributed to the solubilization of hemicelluloses.

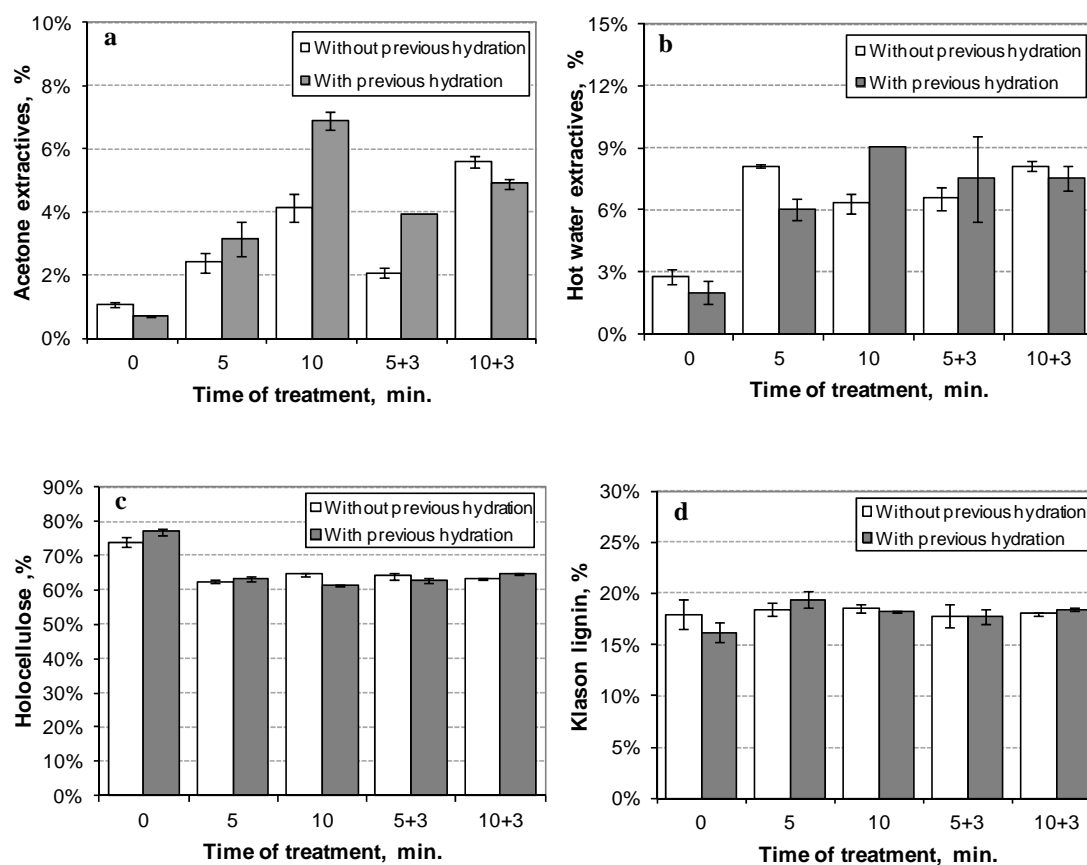


Fig. 2. Relative percentages of acetone extractives (a), hot water extractives (b), holocellulose (c), and Klason lignin (d).

Removal of hemicelluloses with SE under different severity treatments has been well reported. Hendriks and Zeeman (2009) have described the degradation of isolated hemicellulose with steam and the formation of acids that could catalyze further hydrolysis (autohydrolysis). Ruiz et al. (2008) have also reported the degradation of cellulose and mainly hemicelluloses of sunflower stalks but at higher temperatures (180 to 230 °C) than those used in our assays. Other authors have found a loss of 30% of xylose in bamboo (*Phyllostachys pubescens*) treated with SE; xylose is the major component of hemicellulose (Shao et al., 2008). A removal of 47% of xylan was also found after SE of *E. globulus* in a previous report (Martín-Sampedro et al. 2011d).

In the biorefinery, SE poses the risk of producing compounds such as furfural, HMF, and soluble phenolic compounds, which can inhibit enzyme activity (Punsuvon et al. 2008; Ximenes et al. 2010). Formation of these compounds would partly explain the changes in the percentages of acetone and hot water extractives shown in Fig. 2 and would be consistent with the decrease in holocellulose content observed in all the treated *E. globulus* samples. However, in the liquid fractions obtained in our study, neither furfural nor HMF was detected in the HPLC analysis, indicating that hydrolysis reactions

largely predominated over degradation reactions such as dehydration. This finding was probably due to the fact that milder steam explosion conditions were used in the present study (severity factor from 3.1 to 3.5) compared to those applied by other authors (from 3.5 to 4.3) (Li et al. 2005). Therefore, the use of a less intensive steam explosion pre-treatment before enzymatic hydrolysis in bioethanol production could be an alternative option to reduce the inhibiting products. Nevertheless, it is also possible that these volatile products were not quantitatively recovered in the liquid fraction because they were partially lost to the atmosphere after explosive decompression (Emmel et al. 2003).

Finally, Fig. 2d shows that there were no significant changes in the Klason lignin content. The results could indicate that no quantitative changes occurred in the lignin fraction after SE. However, the darkening of the treated chips suggests that some kind of reaction, possibly condensation, took place, making the lignin macromolecule more resistant to solvent extraction. Several authors (Donaldson et al. 1988; Michalowicz et al. 1991) have reported that SE did not remove lignin but induced a redistribution of lignin as a result of melting and agglomeration due to surface tension effects generated during the SE treatment. However, other authors (Excoffier et al. 1991) have reported that lignin softens under the heat and slowly depolymerizes, causing the solubilization of a small part of the original lignin. Thus, Table 2 shows that the percentage of Klason lignin remaining in the solid (compared to the original amount in the raw material) decreased when the severity of the treatment increased. This lignin solubilization agrees with the increase in acetone extractive above mentioned.

Table 2. Steam Explosion Yield and % of Holocellulose and Klason Lignin Remained in the Solid after the SE Treatment, Compared to Raw Material (C1)

Sample	Steam explosion Yield	% Holocellulose remained	% Klason lignin remained
C1	100	100	100
C2	99.9	100	96.2
NH-5	94.6	80.0	97.2
H-5	94.8	81.3	100
NH-10	93.8	81.9	96.6
H-10	85.5	71.0	86.5
NH-5+3	90.4	78.4	89.7
H-5+3	88.1	74.8	86.9
NH-10+3	87.6	74.9	87.9
H-10+3	79.7	69.8	81.8

Water Retention Capacity

The hydration capacity of the steam-exploded chips during a time interval gave evidence of changes in the internal structure of the material and the macro-structural effects of the different SE treatments. As shown in Fig. 3, there was a significant increase in the water retention capacity of all samples after SE, both in non-hydrated and hydrated

samples. This effect was more pronounced for more intense treatments: two cycles or longer durations.

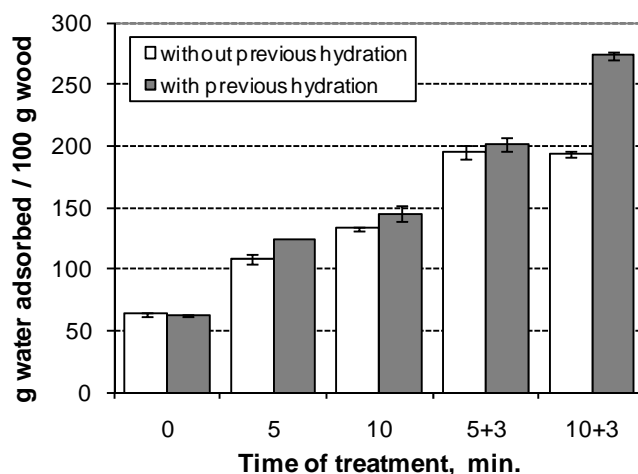


Fig. 3. Water retention capacity

Longer treatments enabled a higher amount of saturated steam to penetrate into the chips, and so decompression resulted in a more intense defibration of the chips. Two cycles of SE also increased the internal rupture of wood, and its effect was even more outstanding than that of extending the treatment. The consequence, in both cases, was an improved capacity of the eucalyptus chips to retain water because there was more available surface inside them.

An increase in water retention was also observed when the chips were hydrated before SE. Previous hydration replaced air by water inside the wood chips. It is supposed that, in non-hydrated wood chips, occluded air partially prevents steam penetration into the material. As a result, decompression brings about a less intense decomposition in non-hydrated chips, which consequently, show lower water retention. Pre-hydration is also likely to have caused a removal of extractives, making steam penetration easier and increasing the hydrophilicity of the material.

Since the increase in water retention capacity is a consequence of the opening of new spaces within the material, SE can be used either to improve the accessibility of chemicals in kraft pulping, as previously reported (Martin-Sampedro et al. 2011a), or, as some postulate (Ruiz et al. 2008), to facilitate enzyme penetration into the lignocellulose, in the biorefinery concept. In this last scenario, a more detailed description of the size and distribution of new pores in the wood will be needed to estimate the probability of enzyme penetration (see next section).

Structural Properties

A structural characterization, assessing the changes in the porous network and the surface configuration of the material, was developed as part of our research. This part of our study was intended to reveal structural modifications in the treated material that might be related with changes in the pore size distribution and accessible surface. As the

accessibility of the material to penetration of chemical reagents and enzymes can be directly related with the effectiveness of the chemical or biological processes, these structural changes would have a great relevance.

The results showed a heterogeneous and broad band of relative pore volumes, with pore size diameters ranging from 20 to 100 micrometers (data not shown) that would correspond to the lumen space of the cell and vessels.

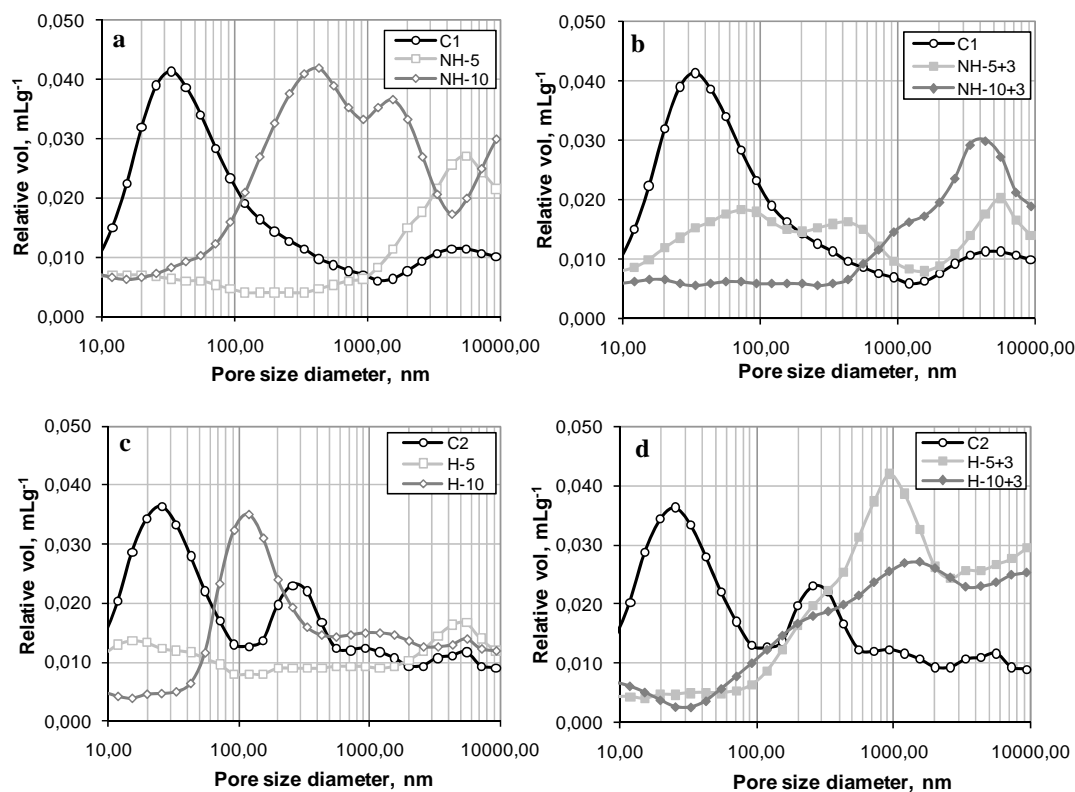


Fig. 4. Relative pore volume versus pore size diameter. Samples without previous hydration (NH) (a and b), samples previously hydrated (H) (c and d). C1 and C2 indicate control without and with previous hydration respectively. The numbers after NH or H indicate the duration of the cycles in minutes.

Figure 4 shows changes in relative pore volume (mL g^{-1}) versus pore diameter of samples without previous hydration, and with one (Fig. 4a) and two cycles (Fig. 4b) of SE. It should be noted that the control is a unique sample in both figures, and that it exhibits a band with a maximum ca. 33 nm. This broad band included the greater pore volume of the control sample and ranged from 10 to 200 nm of pore diameter. The control also showed a lower peak, between 3 and 4 μm , which corresponds to bigger but less abundant pores. In the two samples treated with one cycle of SE (5 and 10 minutes), there was a significant displacement of the band to greater pore size diameters. In this pore size diameter range, the 10 minute treatment produced the biggest pore volume. The addition of a second cycle generated pores with diameters between 3-4 and 6 μm . Again,

the biggest pore volume in this range resulted from the longest treatment. The structural analysis of previously hydrated samples (Figs. 4c and 4d) showed also a significant displacement of the pore volume band from a smaller pore size to a greater pore diameter. In comparison to the non-hydrated control, the hydrated control sample reveals an additional band around 300 nm. These pores would have been produced during pre-hydration of the sample, caused by solubilization of some wood components in water (Romero et al. 1992). This new type of pores is related to the greater effect that SE has on hydrated samples, as penetration of steam into these newly formed pores leads to the formation of bigger pores than those originated when there is no previous hydration.

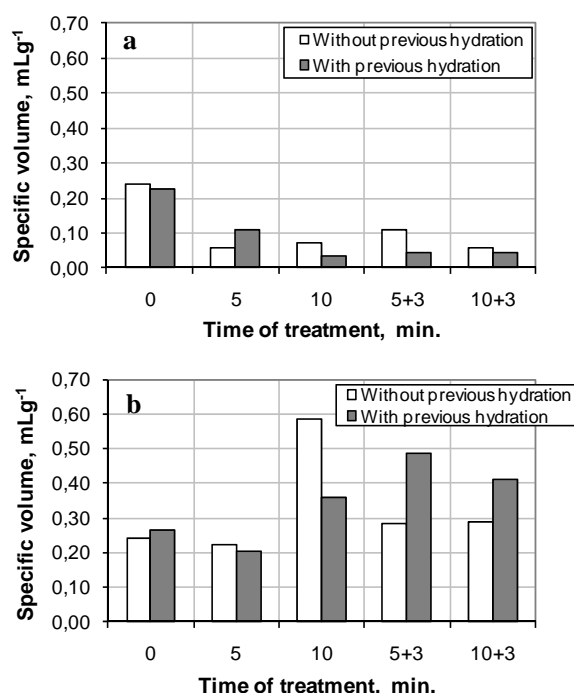


Fig. 5. Mesopore (a) and macropore (b) specific volume for every sample

These results revealed a redistribution of the pore network in the treated material, with a decrease of volume of small pores and an increase of volume of bigger pores. Since there was not an increase of the total pore volume in the pore size range between 10 and 10,000 nm (data not shown), these results can be explained by assuming the formation of pores of longer diameters derived from small pores. This can be observed in Fig. 5, which shows the mesopore (pore diameter: 7-50 nm) and macropore (pore diameter: 50-10,000 nm) specific volume (mL g⁻¹) for every sample analyzed. The results reveal a clear decrease of the mesopore relative volume in all treated samples, both previously hydrated and non-previously hydrated (Fig. 5a). The relative volume of macropores (Fig. 5b) increased in all treated samples, except for those exposed to the mildest SE. In these cases (1 only cycle of 5 minutes), the results were similar to those obtained with the control samples. These results confirm the possibility that there is a reorganization of the pore network rather than creation of new pore volume, in this pore size range. Thus, we may conclude that there is a global positive effect of SE on the

formation of new bigger sized pores that improves the accessibility of chemical reactants and enzymes to the wood chips.

Considering the fact that the analysis of the hydration capacity (Fig. 3) revealed greater water absorption conferred by SE, and taking into account that there is no significant increase of the total pore volume in the diameter range studied here, it is reasonable to conclude that there must be a direct relationship between the new pore matrix of the material and the kinetics of water penetration. The increase in water retention/hydration capacity of the exploded samples indicates that water absorption lasts long enough (6 hours) for water to fill the new bigger pores formed. In the control samples, this phase is not long enough for water to penetrate into the smaller pores, which manifests itself as a clear difference between control and treated samples.

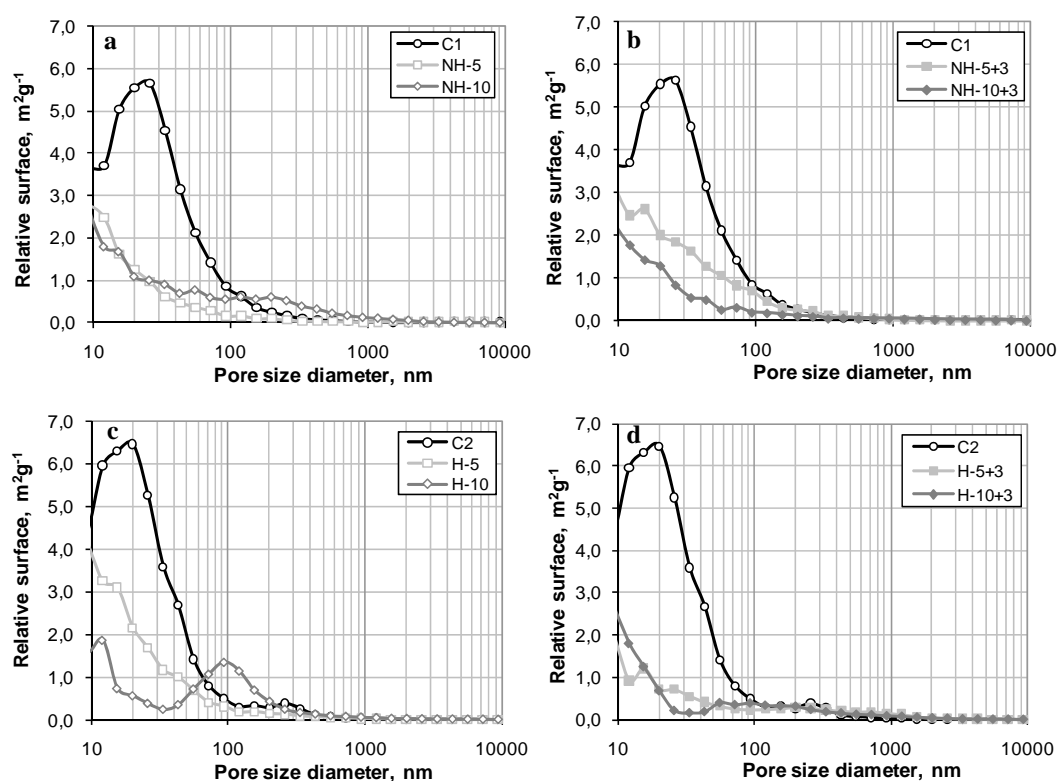


Fig. 6. Relative surface versus pore size diameter. Samples without previous hydration (NH) (a and b), samples previously hydrated (H) (c and d). C1 and C2 indicate control without and with previous hydration respectively. The numbers after NH or H indicate the duration of the cycles in minutes.

The relation between pore size and accessible surface was also evaluated in order to get clear knowledge of the cost, in terms of surface, posed by the formation of bigger pores derived from smaller pores. In Fig. 6 the relative surface area ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) has been plotted versus pore size diameter (nm) for every sample tested. When the pore diameter ranged between 10 and 100 nm, there was a clear decrease in the relative surface in all the treated samples, which corresponds to the disappearance of small pores in these

samples, as it has been explained above. These results correlated with those shown in Figs. 4 and 5 and confirm the decrease in the relative pore volume for pore size diameters between 10 and 100 nm.

Formation of macropores within the pore size diameter range from 100 to 1000 nm produced only a slight increase of relative surface area, as the ratio surface/volume decreases as pore volume increases. Therefore the relative surface area decreased significantly in all treated samples when the pore size diameter was within the 10 to 10,000 nm range. A direct consequence of these results may be in relation to the balance between greater accessibility of the newly created pore network and the reduction of surface accessible to the subsequent attack of chemical reagents or macromolecules such as enzymes. Depending on the nature of the reaction or process that the material would be subjected to, the porosity and surface changes would have a different effect.

CONCLUSIONS

1. Steam explosion is an appropriate alternative treatment in the fractionation of *E. globulus* wood for different applications, as it produces modifications that could enhance subsequent processes.
2. An increase in acetone and hot water extractives (between 1.0-6.2% and 3.6-7.1%, respectively), and a decrease in holocellulose content (9.4-15.6%), were observed after SE. However, there was only a minor variation of the relative Klason lignin content when comparing the composition of samples before and after steam explosion treatment.
3. Results of studying the water retention capacity, the relative porosity, and the relative surface suggest that the wood structure was redistributed, resulting in a decrease of the volume of mesopores and an increase of macropores in the exploded samples.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via Projects CTQ 2006-00385 and CTQ 2009-11268, the “Ramón y Cajal” Programme, and the FPI fellowship (BES2007 – 14528).

REFERENCES CITED

- Ahvazi, B., Radiotis, T., and Bouchard, J. (2007). “Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips,” *J. Wood Chem. Technol.* 27, 49-63.
- Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, M., Manzanares, P., Negro, M. J., and Castro, E. (2008). “Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning,” *Fuel* 87, 692-700.

- Chandra, R. P., Bura, R., Mabee, W. E., Berlin, A., Pan, X., and Saddler, J. N. (2007). "Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?" *Biofuels. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 108, 67-93.
- Corredor, D. Y., Sun, X. S., Salazar, J. M., Hohn, K. L., and Wang, D. (2008). "Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments," *J. Biobased Mat. Bioener.* 2(1), 43-50.
- Donaldson, L. A., Wong, K. K. Y., and Meckie, K. L. (1988). "Ultrastructure of steam-exploded wood," *Wood Sci. Technol.* 22, 103-114.
- Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F., and Ramos, L. P. (2003). "Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion," *Bioresour. Technol.* 86(2), 105-115.
- Excoffier, G., Peguy, A., Rinaudo, M., and Vignon, M. (1991). "Evolution of lignocellulosic components during steam explosion. Potential applications," International workshop of steam explosion techniques: Fundamentals and industrial applications: Routledge, pp. 83-95.
- Heitner, C., Argyropoulos, D. S., Miles, K. B., Karnis, A., and Kerr, R. B. (1993). "Alkaline sulphite ultra-yield pulping of aspen chips – A comparison of steam – explosion and conventional chemimechanical pulping," *J. Pulp & Paper Sci.* 19(2), 58-70.
- Hendriks, A. T. W. M., and Zeeman, G. (2009). "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass," *Bioresour. Technol.* 100, 10-18.
- Li, J., Henriksson, G., and Gellerstedt, G. (2005). "Carbohydrate reactions during high-temperature steam treatment of aspen wood," *Appl. Biochem. Biotech.* 125(3), 175-188.
- Li, J., Lennholm, H., Henriksson, G., and Gellerstedt, G. (2001). "Bio-refinery of lignocellulosic materials for ethanol production. II. Fundamentals and strategic design of steam explosion," in: *Proceedings of the First World Conference on Biomass for Energy and Industry*, Kyritsis, S., Bernackeres, A. A. C. M., Helm, P., Grassi, A., and Chiaramonti, D. (eds.), Vol. 1, pp. 767-770.
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M. E., Revilla, E., Martín, J. A., and Villar, J. C. (2011a). "Integration of kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment," *BioResources* 6(1), 513-528.
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M. E., Carbajo, J. M., and Villar, J. C. (2011b). "Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping," *Bioresour. Technol.* 102, 7183-7189.
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M. E., and Villar, J. C. (2011c). "Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips," *Bioresour. Technol.* 102, 4530-4535.
- Martin-Sampedro, R., Capanema, E. A., Hoeger, I., Villar, J. C., and Rojas, O.J. (2011d). "Lignin changes after steam explosion and laccase-mediator treatment of eucalyptus wood chips," *J. Agric. Food Chem.* 59, 8761-8769.
- Michalowicz, G., Toussaint, B., and Vignon, M. R. (1991). "Ultrastructural-changes in poplar cell-wall during steam explosion treatment," *Holzforschung* 45(3), 175-179.

- Moniruzzaman, M. (1996). "Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw," *Appl. Biochem. Biotechnol.* 59, 283-297.
- Overend, R. P., and Chornet, E. (1987). "Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments," *Philos. Trans. Royal Soc. Lond. A* 321, 523-536.
- Punsuvon, V., Vaithanomsat, P., and Iiyama, K. (2008). "Simultaneous production of alpha-cellulose and furfural from bagasse by steam explosion pretreatment," *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 2(1), 182-191.
- Romero, A., Garcia-Ochoa, F., and Caperos, A. (1992). "Modeling resin extraction from wood with different solvents," *Tappi J.* 75(8), 141-145.
- Rouquerol, J., Avnir, D., Firbridge, C. W., Everett, D. H., Haynes, J. H., Pernicone, N., Ramsay, J. D. F., Sing, K. S. W., and Unger, K. K. (1994). "Physical and biophysical chemistry division commission on colloid and surface chemistry including catalysis," *Pure Appl. Chem.* 66, 1739-1758.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., and Castro, E. (2008). "Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks," *Enz. Microb. Technol.* 42, 160-166.
- Shao, S. L., Wen, G. F., and Jin, Z. F. (2008). "Changes in chemical characteristics of bamboo (*Phyllostachys pubescens*) components during steam explosion," *Wood Sci. Technol.* 6, 439-451.
- Sun, F. B., and Chen, H. Z. (2008). "Comparison of atmospheric aqueous glycerol and steam explosion pretreatments of wheat straw for enhanced enzymatic hydrolysis," *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83, 707-714.
- Tengborg, C., Galbe, M., and Zacchi, G. (2001). "Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood," *Enzyme Microb. Technol.* 28, 835-844.
- Viola, E., Cardinale, M., Santarcangelo, R., Villone, A., and Zimbardi, F. (2008). "Ethanol from eel grass via steam explosion and enzymatic hydrolysis," *Biomass Bioener.* 32, 613-618.
- Wise, L. E., Murphy, M., and D'Adieco, A. (1946). "Chlorite holocellulose, its fractionation and beating on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses," *PaperTrade J.* 122, 35-43.
- Ximenes, E., Kim Y., Mosier, N., Dien, B., and Ladisch, M. (2010). "Inhibition of cellulases by phenols," *Enzym. Microb. Technol.* 46, 170-176.

Article submitted: September 4, 2011; Peer review completed: October 5, 2011; Revised version received and accepted: October 14, 2011; Published: October 18, 2011.

PUBLICACIÓN II:

Lignin changes after steam explosion and laccase-mediator treatment of eucalyptus wood chips.

Martín-Sampedro, R., Capanema, E.A., Hoeger, I.C., Villar, J.C., Rojas, O.J.

Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. 59(16): 8761-8769

Lignin Changes after Steam Explosion and Laccase-Mediator Treatment of Eucalyptus Wood Chips

Raquel Martin-Sampedro,[†] Ewellyn A. Capanema,[§] Ingrid Hoeger,[§] Juan C. Villar,[†] and Orlando J. Rojas^{*,§,#}

[†]Laboratorios de Celulosa y Papel, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040 Madrid, Spain

[§]Department of Forest Biomaterials, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, 27695-8005, United States

[#]Faculty of Chemistry and Materials Sciences, Aalto University, FI-02015 Espoo, Finland

ABSTRACT: *Eucalyptus globulus* chips were steam exploded followed by treatment with a laccase-mediator system (LMS) under different experimental conditions. Removal of hemicelluloses and, to a lesser extent, lignin was observed. Thermogravimetric analyses of whole meal obtained from chips before and after steam explosion indicated an increase in lignin degradation temperature due to lignin condensation. In contrast, application of LMS treatment caused a reduction in lignin and polysaccharide degradation temperatures. Lignins were isolated from wood samples before and after each treatment and analyzed by 2D NMR and ¹³C NMR. An increase in carboxyl and phenolic hydroxyl groups and a significant decrease in β -O-4 structures were found in steam-exploded samples. The most relevant changes observed after laccase treatment were increased secondary OH and degree of condensation.

KEYWORDS: *Eucalyptus globulus*, steam explosion, laccase-mediator system, thermogravimetric analyses (TGA), milled wood lignin (MWL), 2D NMR, HSQC, quantitative ¹³C NMR, lignin thermal properties, lignin chemistry

INTRODUCTION

In steam explosion, biomass is subjected to high-pressure steam followed by a rapid decompression, which forces the fibrous material to “explode” into component fibers and fiber bundles. Therefore, steam explosion is effective in opening up biomass structure and increases chemical reactivity for further operations.¹ Steam explosion has also been proposed as a pretreatment method to enhance the susceptibility of cellulose fibers to enzymatic hydrolysis to produce fermentable sugars^{2,3} and to assist in the fractionation of its components.^{4,5}

When no other chemicals are added to the process, the main reaction that takes place is an autohydrolysis of the ether bonds present in polysaccharides and lignin. The high-temperature steam leads to the release of acetic acid from wood components, which catalyze hydrolytic reactions of constituent polymers. These reactions result in a loss of hemicelluloses and amorphous cellulose and decrease the amount of β -O-4 structure in lignin.^{6–9}

During steam explosion and other related processes, lignin is one of the most recalcitrant polymers present. Lignin is a macromolecule containing aromatic and aliphatic moieties. Despite extensive investigations, the structure of lignin, especially that in hardwoods, is not completely understood. Lignin isolation from wood and further structural characterization is usually difficult because it is covalently linked to carbohydrates, forming a complex lignin–carbohydrate network.^{10,11} Björkman¹² used aqueous dioxane solvent to obtain a milled wood lignin (MWL), which has been used as a reference for native lignin. In general, the most common techniques for lignin isolation are based on extraction of ball-milled wood by neutral solvents.

Changes occurring in MWL from aspen, birch, and pine after steam explosion have been studied by nuclear magnetic resonance (NMR), thioacidolysis, size exclusion chromatography (SEC), nitrobenzene oxidation, and other techniques. A reduction in the

content of β -O-4 structures due to depolymerization reactions and an increase in the content of C–C condensed structures have been observed.^{6,7,13} Furthermore, Li et al.¹³ reported an increase in the average molecular weight and a more heterogeneous lignin structure with the severity of the steam explosion conditions. Such observations were explained by lignin condensation reactions.

The effect of steam explosion on the structure of lignin in wood, its properties, and tolerance for downstream delignification are subjects that have been addressed in the literature. However, systematic studies are still needed to elucidate the effect of wood species, steam explosion severity, method of lignin isolation, etc. Most of the published results have been obtained from alkali-extracted lignins, and data on the structure of the residual lignin are limited. Therefore, the aim of this work is to elucidate the relationship between the intensity of the steam explosion process and key structural features of MWL lignin from *Eucalyptus globulus*, as well as the susceptibility of the exploded material to enzymatic oxidation by laccases. Related research questions are relevant when the use of steam explosion assisted with enzymatic treatment is considered as a choice for effective transformation of lignocellulosics in biorefinery or biopulping platforms. For instance, in the production of bioethanol, the laccase-mediator system (LMS) treatment has been used to remove inhibiting compounds.^{14,15} In paper production, LMS treatments between steam explosion and kraft pulping increase the delignification rate,¹⁶ even when applied on substrates with high lignin content.

As such, changes in the structure of lignin isolated from *E. globulus* chips were analyzed by 2D NMR and ¹³C NMR

Received: April 21, 2011

Revised: July 9, 2011

Accepted: July 12, 2011

Published: July 12, 2011

before and after steam explosion. Also, changes in lignin after laccase treatment were investigated to elucidate the impact of steam explosion in downstream enzymatic treatments. Finally, thermogravimetric analyses (TGA) were carried out on whole meal biomass before and after steam explosion and enzyme treatment to determine the effects of process conditions on the thermal properties of the lignocellulosic material.

MATERIALS AND METHODS

All of the chemicals used were of reagent grade and were obtained from Sigma-Aldrich.

Wood chips of *E. globulus* were kindly supplied by La Montañanesa pulp mill (Torraspapel group, Spain). The laccase used in enzymatic treatments (Novozym 51003) was supplied as a donation by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

Steam Explosion Treatment. The *E. globulus* chips were dried and homogenized at room temperature for 2 weeks, and the moisture content was determined (ISO 638). The size of the chips was around $2 \times 3 \times 0.5$ cm. Before the steam explosion treatment, the chips were separated into eight 500 g batches. Four of them were immersed in distilled water during 16 h at 25 °C; the others were kept at room temperature. These two types of samples were used to evaluate the effect of impregnation on the subsequent steam explosion treatment. The steam explosion treatment was performed in a 26 L stainless steel vessel by charging steam to operation temperature and pressure of 183 °C and 10 kg-f/cm², respectively. After these conditions had been reached (typically within 3 min after steam injection), variable residence times were applied. At the end of the steam treatment, the pressure was reduced to 6 kg-f/cm², and then the chips were discharged into an expansion (blowing) tank at atmospheric pressure. After discharging, the chips were washed with water. The steam explosion factors evaluated in this work included the use of preimpregnation of wood chips in water, the number of steam explosion cycles (one or two), and the time employed during the first cycle (5 or 10 min). Table 1 summarizes the conditions used and the nomenclature used thereafter to indicate the respective steam-exploded (SE) samples.

The severity factor, S_0 , for each treatment was calculated according to eq 1 defined by Overend and Chornet¹⁷ as a function of the temperature (T , °C) and the duration of the treatment (t , min).

$$S_0 = \log(e^{(T-100)/14.75} \times t) \quad (1)$$

Enzymatic Treatment. The steam-exploded sample denoted SE4' was treated with a laccase-mediator system. Enzyme treatment was performed in 500 mL flasks with air bubbling placed in a temperature-controlled shaker operating at 100 rev/min. The LMS consisted of the laccase enzyme (30 U of laccase per gram of dry SE wood) and HBT (5 mM), which was used as mediator. The temperature, time, and pH of treatment were 70 °C, 30 min, and 6 (100 mM phosphate buffer), respectively. The final concentration of the substrate (steam-exploded chips) was 7% (w/v). Here, 1 U of laccase is defined as the amount of laccase required to convert 1 μ mol/min of ABTS to its cationic radical (0.1 M phosphate buffer, pH 6, at 24 °C). A control experiment with no LMS was carried out (sample SE4'+control-L).

Thermogravimetric Analysis. TGA of wood meal samples (ground to pass a 20 mesh screen) were conducted in a TA Instruments model Q-500. Fifteen milligrams of the respective sample were used, and the thermograms were obtained by ramping the temperature from 30 to 600 °C at a heating rate of 10 °C/min. An air atmosphere was maintained at 60 mL/min flow rate.

Isolation of Milled Wood Lignin. A modified MWL isolation procedure¹⁸ was used to isolate lignin from *E. globulus* wood. The same procedure was employed in the isolation of lignin from wood after steam explosion and enzymatic treatments. The detailed procedure followed in

Table 1. Summary of Conditions Used in Steam Explosion of *Eucalyptus globulus* Chips

sample	water soaking prior to steam explosion (16 h, 25 °C)	residence time during steam explosion (min)		severity factor (S_0)
		cycle 1	cycle 2	
control	no			
SE1	no	5		3.14
SE1'	yes	5		3.14
SE2	no	10		3.44
SE2'	yes	10		3.44
SE3	no	5	3	3.35
SE3'	yes	5	3	3.35
SE4	no	10	3	3.56
SE4'	yes	10	3	3.56
SE4'+laccase ^a	yes	10	3	3.56
SE4'+control-L ^b	yes	10	3	3.56

^a SE4'+laccase, same as SE4' but included a treatment of the chips after the second cycle of steam explosion with laccase-mediator system.

^b SE4'+control-L, a control sample after same treatment used in SE4'+laccase but with no laccase-mediator system added.

the isolation of MWL is shown schematically in Figure 1. Briefly, chips were ground to pass a 20 mesh screen in a Wiley mill and extracted with an ethanol/toluene mixture 1:2 (v/v). The extractive-free wood meal was submitted to an alkaline extraction mainly to remove tannins. The obtained extracted wood was then thoroughly washed until pH-neutral, dried under vacuum, and subjected to ball-milling in a planetary ball mill (Fritsch Planetary Mill P7). The resulting wood residue was extracted with dioxane/water solution (96:4) during 72 h. The dioxane extracts were combined and concentrated under vacuum. The extracted MWL was dried under vacuum and stored in a desiccator for further analyses.

The liquor from the alkali extraction was acidified at pH 2 by adding H₂SO₄ and the precipitated lignin recovered by filtration, water-washed until pH-neutral, air-dried, and stored for further analyses.

The milling time and intensity (as given by the number of balls per gram of sample) were adjusted to obtain yields between 30 and 50%. This was done to ensure MWL samples that could be taken as close as possible to the native lignin.¹¹ Also, processing the material to a similar isolation yield facilitates a better comparison between different samples. Acetylation of the MWL, for NMR analysis, was carried out according to a procedure reported earlier by Capanema et al.¹⁹

Carbohydrate Composition and Klason Lignin. The carbohydrate composition was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses after acid hydrolysis of the wood samples.²⁰ The equipment used consisted of an Agilent Technology 1200 series RID with an Aminex HPX-87H column operated at 50 °C with a mobile phase consisting of 5 mM sulfuric acid pumped at a rate of 0.6 mL/min. Klason lignin content in the wood samples and solid fractions obtained during the isolation procedure (see Figure 1) were determined according to TAPPI T222 om-88 standard.

NMR Analyses. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 MHz spectrometer at 25 °C using DMSO-*d*₆ as the solvent under conditions optimized and reported earlier.^{19,21} Chemical shifts were referenced to TMS (0.0 ppm). Heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) analysis was performed with a 5% solution of lignin by applying a 90° pulse width, a 512 ms acquisition time, a 1.2 s pulse delay, and ¹J_{C-H} of 147 Hz. For the quantitative ¹³C NMR, the concentration

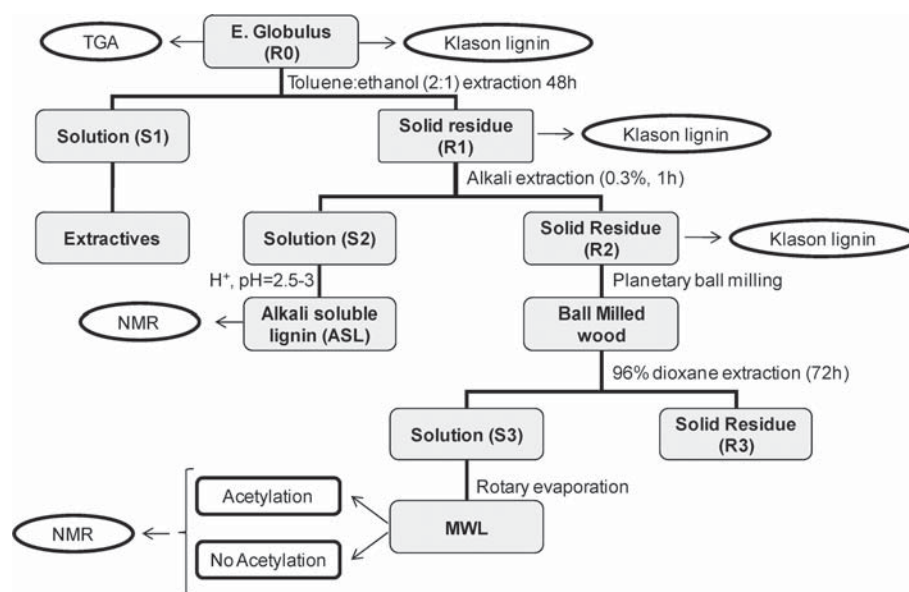


Figure 1. Schematic block diagram of milled wood lignin isolation indicating main analyses performed such as Klason lignin, TGA, 2D and ^{13}C NMR (ovals), and samples with respective nomenclature (squares).

of lignin was $\sim 20\%$; a 90° pulse width, 1.4 s acquisition time, and 1.7 s relaxation delay were used. Chromium(III) acetylacetonate (0.01 M) was added to the lignin solutions to provide complete relaxation of all nuclei. A total of 20000 scans were collected. A quantitative ^1H NMR spectrum of acetylated MWL was recorded at a lignin concentration of $\sim 20\%$ in DMSO, with a 90° pulse width and a 1.3 s acquisition time.

RESULTS AND DISCUSSION

Thermal Properties. Thermogravimetric analyses were used to characterize the different wood chip samples. The analysis was based on the fact that each of the fiber cell wall polymers has a distinctive degradation temperature and rate of energy release upon thermal breaking and combustion. During TGA the lignocellulosic samples were kept under air atmosphere, and two main temperature ranges of degradation were observed, 250–350 and 400–500 $^\circ\text{C}$. These are attributed to degradation of polysaccharides and lignin, respectively.²² Relative to cellulose and hemicelluloses, which are aliphatic structures, the higher degradation temperature for lignin is ascribed to its aromatic structure. For hemicelluloses and cellulose two consecutive processes have been determined during biomass combustion. The first one corresponds to a thermal decomposition (volatilization) that produces volatiles and char. The second reaction involves char oxidation in the presence of oxygen. Volatilization and oxidation of lignin-derived char are considered to be concurrent processes.²³

TGA spectra for samples before (control) and after the most intense steam explosion treatment (SE4') were analyzed, and the first derivate of the thermograms is shown in Figure 2A. Shifts in degradation temperature were taken as indirect indication of collective changes that occurred in wood components during steam explosion. After steam explosion, an increase by 20 $^\circ\text{C}$ in the second degradation temperature (at about 490 $^\circ\text{C}$), corresponding to lignin, was observed, whereas the degradation temperature for polysaccharides (at about 330 $^\circ\text{C}$) remained approximately constant. Generally, the lower the molecular

weight and/or crystallinity, the lower the temperature for polymer degradation.²⁴ Therefore, the observed increase in lignin degradation temperature suggests possible condensation reactions during steam explosion. Furthermore, a shoulder around 280 $^\circ\text{C}$ was observed in the control sample (untreated wood). This shoulder can be attributed to the degradation of xylans, which are the main hemicelluloses in the hardwood considered in this study²⁵ but are extensively reduced upon steam explosion.¹³ This observation was corroborated by carbohydrate analyses of related samples that showed a progressive reduction of xylans in the exploded samples (see Table 2). A reduction of the amount of lignin was also observed upon steam explosion treatment.

The degradation temperatures attributed to polysaccharides and lignin after the different steam explosion treatments are shown in Figure 2B. It can be observed that after steam explosion the degradation temperature corresponding to polysaccharides remained approximately constant, at about 333 $^\circ\text{C}$, whereas the temperature for lignin degradation increased with the severity of the treatment. For instance, compared with steam explosion in a single cycle, two cycles raised the lignin degradation temperature (see data for SE1–SE3, SE1'–SE3', SE2–SE4, or SE2'–SE4' pairs). Except for sample pair SE3–SE4, the same observation applies when the residence time during steam treatment was increased (see data for SE1–SE2, SE1'–SE2', and SE3'–SE4' pairs). The higher TGA degradation temperature observed with the number of cycles or with the residence time is hypothesized to be the result of lignin condensation. It is also possible that the strong conditions used during steam explosion may promote removal of carbohydrates linked to lignin (lignin–carbohydrate complexes, LCC), as has been reported by others.¹³ This hypothesis is supported by the decrease in intensity of the NMR signal at 81.25/5.1 ppm assigned to benzyl ether linkages between lignin and xylan.²⁶

Laccase treatment of chips after steam explosion under the most severe conditions (sample SE4'+laccase) changed further the respective degradation temperatures of the polysaccharides and lignin, as observed in Figure 3. In fact, a reduction in the degradation temperature by 19 and 31 $^\circ\text{C}$ for lignin and

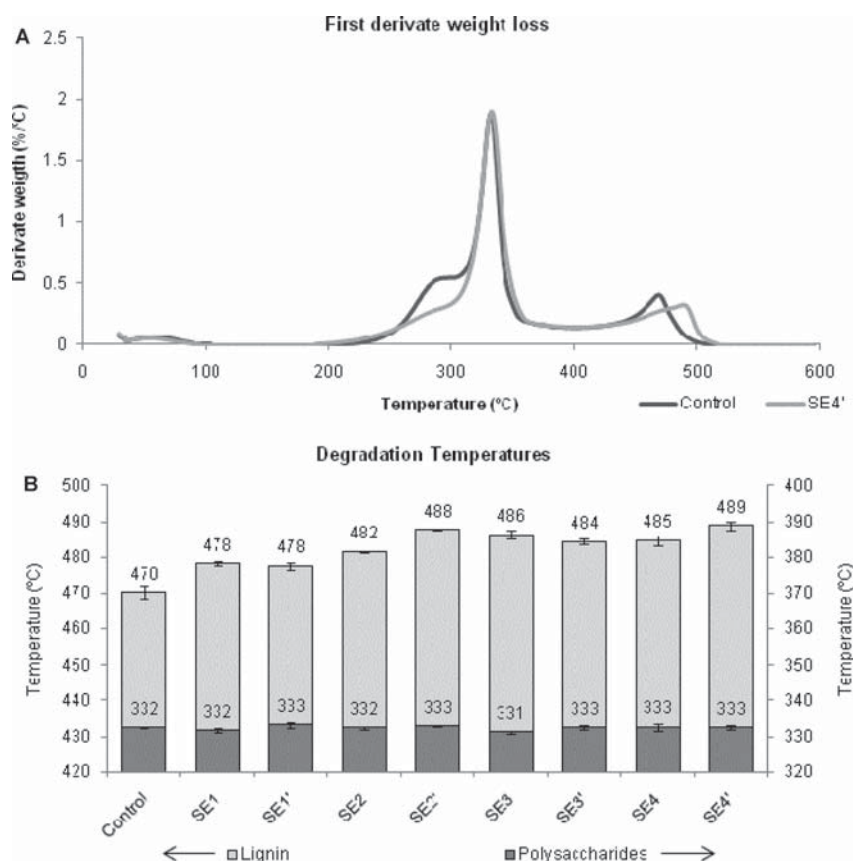


Figure 2. (A) Thermal properties of steam-exploded samples: first derivative of thermograms of *Eucalyptus globulus* wood before (control sample, black profile) and after steam explosion under conditions denoted S4' in Table 1 (gray profile). (B) Lignin and polysaccharide degradation temperatures for the control and steam-exploded samples.

Table 2. Lignin, Glucan, Xylan, Arabinan, and Acetyl Group Content in Exploded Wood Samples, Calculated as the Relative Percent Amount of Each Compound Relative to the Amount in the Original Wood Sample (Control)

	% lignin	% glucan	% xylan	% arabinan	% acetyl groups
control	100	100	100	100	100
SE1	88	100	91	38	81
SE1'	88	100	94	42	82
SE2	90	100	91	41	79
SE2'	80	100	57	14	40
SE3	88	100	82	14	70
SE3'	86	100	66	9	64
SE4	83	100	76	20	89
SE4'	81	96	53	7	77
SE4'+laccase	74	93	46	5	32
SE4'+control-L	75	97	43	6	31

polysaccharide fractions, respectively, was observed after enzyme treatment of the steam-exploded substrates (compare data for SE4' and SE4'+laccase). Importantly, these changes cannot be ascribed to a change in composition due to the addition of the enzyme because no significant differences were observed when a control sample (with no laccase and no mediator, SE4'+control-L) and the laccase-treated sample (SE4'+laccase) were compared. Thus, it is possible that the shifts in degradation temperature are

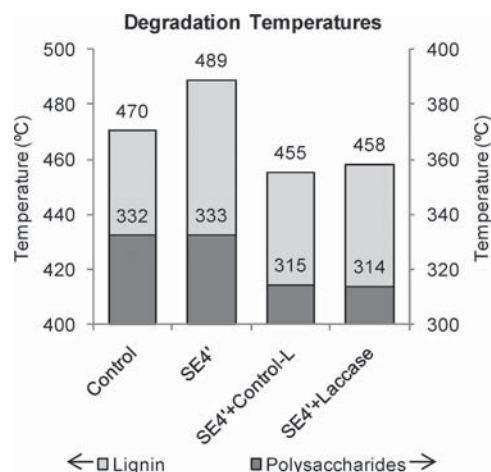


Figure 3. Polysaccharide and lignin degradation temperatures for samples before and after steam explosion and after laccase-mediator treatment (see Table 1 for nomenclature).

related to changes that occurred in the molecular structure and/or bonding features of lignin and cellulose due to relatively high temperatures (70 °C) and the presence of oxygen (air bubbling); for example, depolymerization reactions were possible. However, another plausible explanation is that during enzyme treatment some low molecular weight lignin fractions

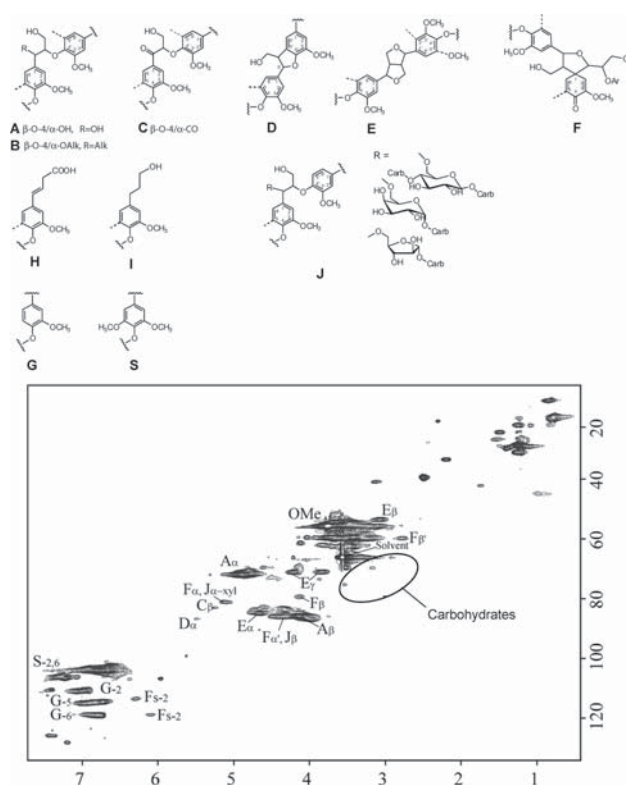
Table 3. Weight and Lignin Content of Residues Obtained in the MWL Isolation Procedure (See also Figure 1 for the Nomenclature Used)

		control	SE4'	SE4'+laccase
R0	yield (%)	100.0	100.0	100.0
	Klason lignin (%)	21.1	23.8	22.5
	acid-soluble lignin (%)	2.5	1.7	1.5
	total lignin content relative to R0	23.6	25.5	24.0
S1	extractives %	2.7	9.6	4.5
R1	yield (%) respect R0	97.3	90.4	93.3
	Klason lignin (%)	20.3	20.1	20.8
	acid-soluble lignin (%)	2.3	1.5	1.4
	total lignin content relative to R0	22.1	19.5	21.2
	lignin yield (%) relative to lignin R0	93.6	76.5	88.3
ASL	yield % relative to R0	2.3	6.9	6.0
	yield % relative to lignin content R0	9.6	26.9	25.0
R2	yield (%) relative to R0	89.1	70.3	87.9
	Klason lignin (%)	20.4	16.8	15.9
	acid-soluble lignin (%)	2.0	1.2	1.2
	total lignin content relative to R0	20.0	12.7	15.7
	lignin yield (%) relative to lignin R0	84.8	49.7	62.6
MWL	yield % relative to lignin content R2	40.5	44.8	42.4
	yield % relative to lignin content R0	34.3	22.2	26.5

and/or small lignin fragments attached to carbohydrates were solubilized in the aqueous solution. This would imply not only a decrease in the degree of polymerization (DP) of the carbohydrates but also the loss of some lignin, which all together can cause a reduction in the degradation temperature.

Isolation of MWL. Lignin was isolated from the untreated wood chips (before steam explosion), after the most intense steam explosion treatment (SE4'), and from a sample subjected to the same steam explosion followed by application of a LMS. The optimization of the milling process that led to the selection of conditions to obtain similar yields, as explained under Materials and Methods, indicated that steam-exploded wood chips (sample SE4') required more intensive milling compared to the original wood. On the other hand, a less intense milling was required in the case of the sample obtained after treatment with LMS (SE4'+laccase). Under the hypothesis that noncondensed lignin is more easily removed in isolation procedure, the results just described for the milling intensity are in support of the TGA that suggested that steam explosion produced lignin condensation reactions. On the other hand, laccase treatment was expected to mainly cause some depolymerization reactions that could reduce the milling intensity required compared to SE4' sample.

After steam explosion of the wood chips the amount of organic extractives and alkali-soluble lignin (ASL in Figure 1 and Table 3) increased. Furthermore, the total lignin content with respect to the original sample (R0) after each extraction was lower for samples after steam explosion than for untreated samples. This observation is in support of conclusions from other studies that indicated that aqueous alkaline or organic solvent extraction

**Figure 4.** HSQC spectrum of MWL from *Eucalyptus globulus* with the respective lignin structures indicated in the upper panel.

resulted in an appreciable delignification of steam-exploded aspen.^{9,27} Robert et al.²⁷ and Lora and Wayman²⁸ have reported that most of the lignin in steam-exploded aspen can subsequently be removed either by extraction with an organic solvent, such as ethanol, acetone, or dioxane, or by extraction with aqueous alkali. However, in the present case the degree of delignification after alkali extraction was comparatively lower than that observed in these studies (26.9 vs 98%). Such a difference can be explained by the fact that milder steam explosion conditions were used in the present study (severity factor of 3.56 vs 4.32). Finally, it is worth mentioning that lignin from aspen, used in the cited references, was found to be the most readily extractable compared with lignin from other hardwoods and also from softwoods.^{28,29}

The ASL yield and extractive percentage for the SE4'+laccase sample were higher than those for the control sample, but lower than those for sample SE4'. This fact could be due to the removal of lignin during laccase-mediator treatment, as Table 2 indicates (7% lignin reduction with respect to control sample).

NMR Analysis. 2D NMR spectra of isolated lignin from *E. globulus* before and after steam explosion, and also after steam explosion and laccase treatment, are shown in Figures 4, 5, and 6, respectively, and their signal assignments were made according to previous studies.^{19,21}

A wide variety of saturated aliphatic moieties with chemical shifts of about δ_H 0.8 and δ_H 1.2–1.3 was observed in the HSQC spectrum. They corresponded to extractives, which were likely chemically bonded to lignin.³⁰ The cross-signal in the lower field (δ_H 1.5–2.5 and δ_C 20–43) corresponded to aliphatic groups neighboring alkene and oxygen-containing groups such as alcohol, carbonyl, and ethers. Furthermore, some minor lignin structures, such as Ar–COCH₂–CH₂OH type moieties and

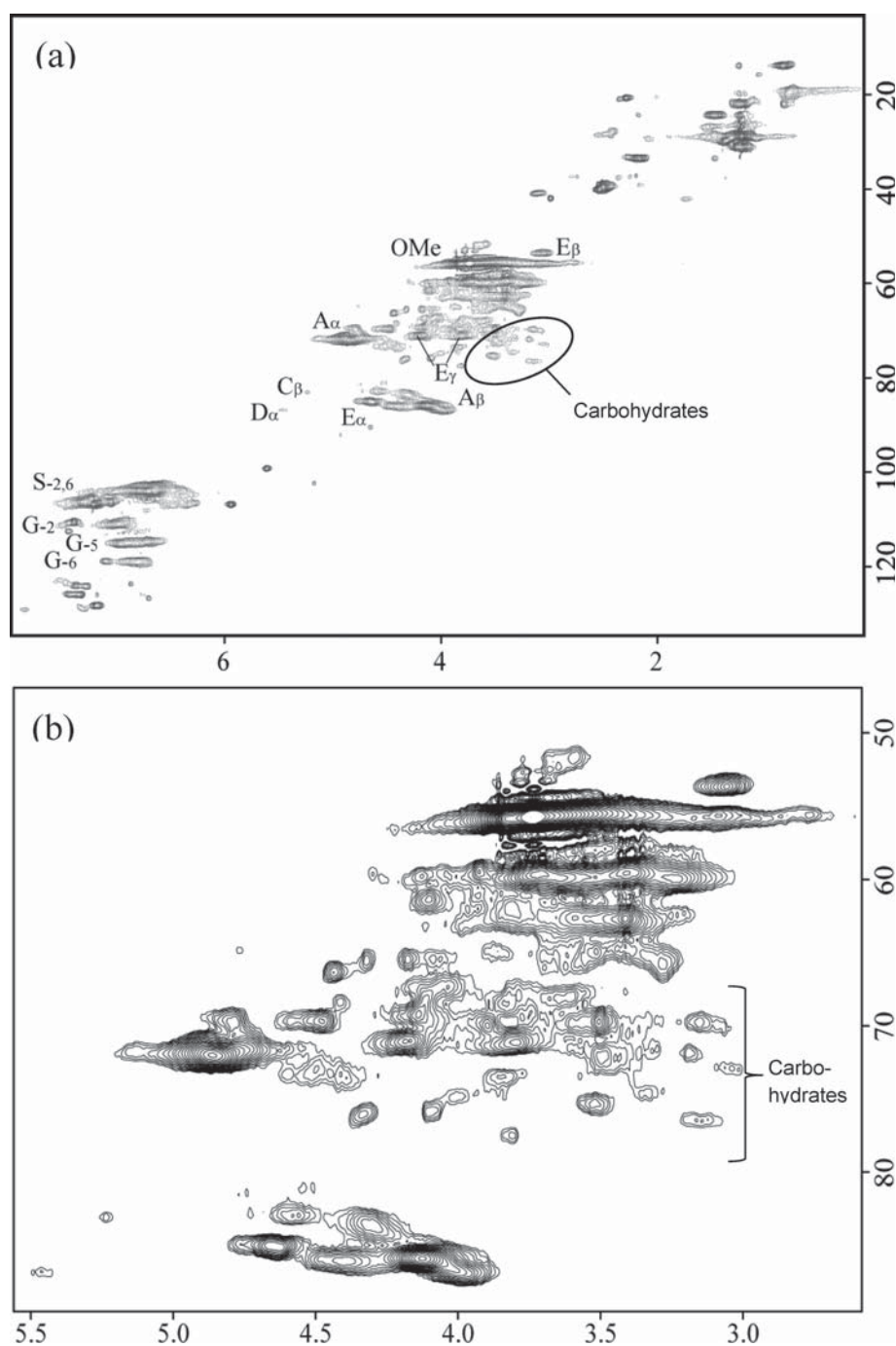


Figure 5. HSQC spectrum of isolated lignin from *Eucalyptus globulus* after steam explosion treatment (SE4') (a). The detailed oxygenated aliphatic region is included in panel b.

dihydroferulic acid type units ($\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$), were identified on the basis of the reported chemical shifts. Weak signals of dihydrocinnamyl alcohol type units ($\text{Ar}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OH}$) (I) were detected in MWL from control *E. globulus* wood, but not in lignin isolated from *E. globulus* after steam explosion and laccase treatments.

In the oxygenated aliphatic region, the signals of the major structures of native lignin such as (β -O-4') (A), phenylcoumaran (β -S') (D), and pino/syringyresinol (β - β') (E) were observed in the three studied lignins (Figures 4, 5, and 6), although the

amounts of β -O-4' and β - β' structures decreased after steam explosion treatment (Table 4).

The cross-peak at $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 83.5/5.28 was assigned to β -CH in β -O-4' moieties of S-type with α -carbonyl groups according to Capanema et al.²¹ The signals of the γ -CH in coniferyl alcohol type units were observed at 61.9/4.12 ppm. These signals were observed in the three isolated lignins.

Weak signals of spirodienone structures (F) were observed in the HSQC spectrum of the MWL from control *E. globulus* wood. The signals at 79.5/4.12 and 81.2/5.1 ppm were assigned to

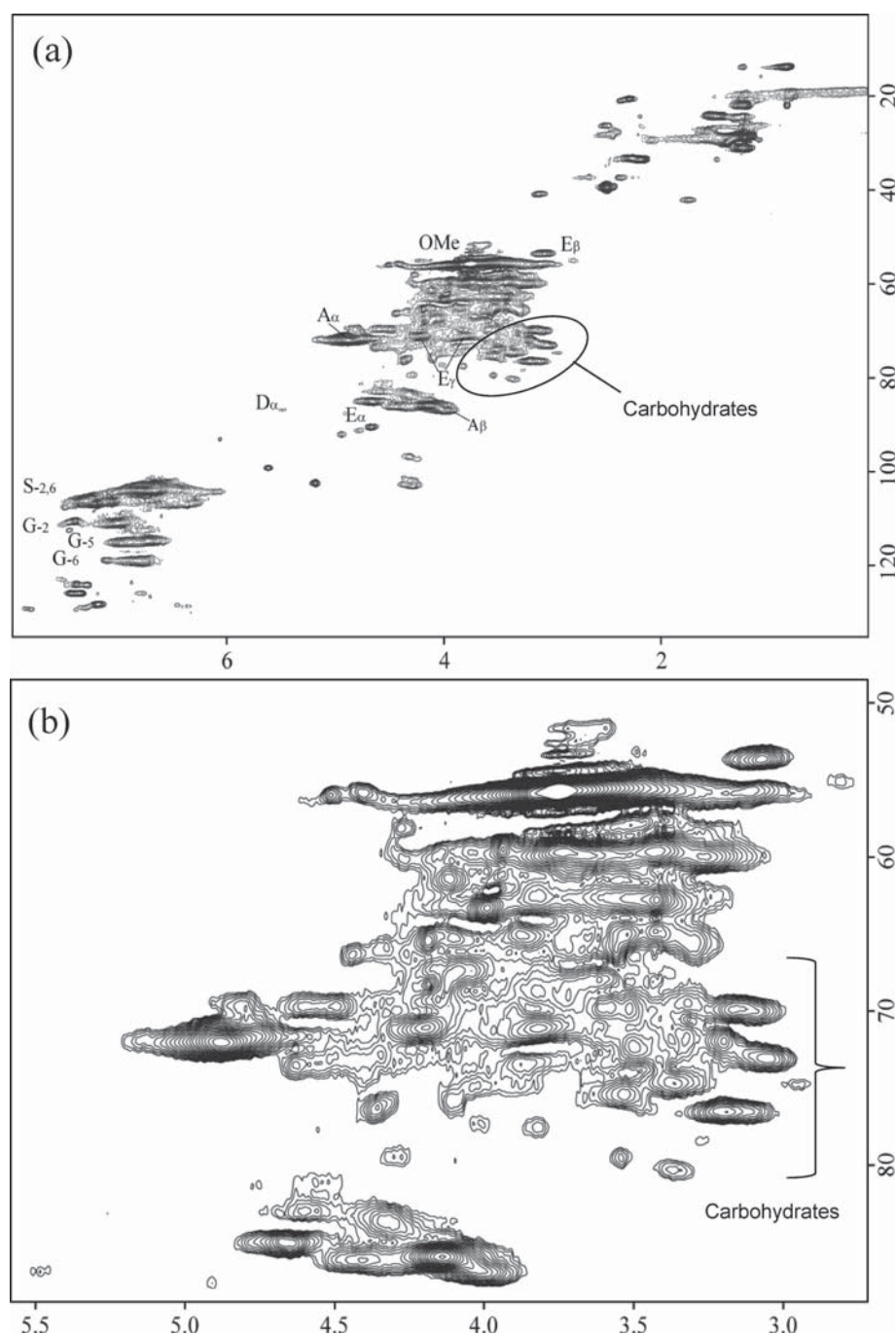


Figure 6. HSQC spectrum of isolated lignin from *Eucalyptus globulus* after steam explosion and laccase-mediator treatment (SE4'+laccase sample) (a). The detailed oxygenated aliphatic region is included in panel b.

β' -CH in the second side chain in the spirodienone and α -CH in spirodienone plus lignin xylan moieties, respectively.^{21,26} These signals were very weak or even disappeared in lignin isolated from wood after steam explosion and steam explosion plus laccase treatment.

The oxygenated aliphatic region also contained cross-signals for xylans and other polysaccharides (δ_C/δ_H 63–75/3.2–3.8) less abundant in MWL from control *E. globulus* wood than in the other lignins analyzed. Lignin carbohydrate linkages were revealed by cross-signals for some β -O-4' substructures that are α -C or γ -C-etherified with carbohydrates (J).³¹

In the aromatic region, a predominance of syringyl (S) over guaiacyl (G) units was observed in the three lignins studied, which is in concordance with the high proportion of S units in hardwood.

Comparison of 2D NMR spectra before and after steam explosion followed or not by laccase-mediator treatment made it evident that lignin preparation isolated from SE4' and SE4'+laccase had higher sugar content than lignin isolated from original wood at the same yield, as observed in the oxygenated aliphatic region (Figures 4, 5b, and 6b). Additionally, 2D NMR spectra qualitatively indicated a very similar observation. Similar

Table 4. ^{13}C NMR Data of the Most Important Lignin Functionalities (per 100 Ar Units)

isolated lignin	COOR	OHpr ^a	OHsec ^a	OHph	β -O-4	OMe	S/G	DC
original (control)	5	69	57	23	64	177	3.2	13
SE4'	16	66	54	47	36	170	3.1	14
SE4'+laccase	17	63	70	53	36	161	3.0	19

^a Includes sugar OH groups.

results were found by Balakshin et al.³⁰ and Ibarra et al.,³¹ who studied the residual lignin after LMS-E treatment and found the HSQC NMR spectra very similar to those of the original residual kraft lignin. They ascribed their observations to a removal of the altered lignin from the pulp during the alkaline extraction, subsequent to the LMS treatment; the residual lignin that remained in the pulp did not undergo substantial changes. In our case, the oxidized lignin could be removed during the alkali extraction performed in the lignin isolation procedure used to remove tannins.

A quantitative study based on ^{13}C NMR was carried out. The quantification of the most important lignin functionalities is indicated in Table 4. The calculations were performed according to the method suggested by Capanema et al.²¹

The amount of aliphatic and conjugated COOH groups estimated from the spectrum of the nonacetylated MWL from control *E. globulus* was found similar to that previously reported.³² However, when wood was subjected to steam explosion, the amount of carboxyl groups increased significantly.

The amount of primary hydroxyl groups observed in SE4' and SE4'+laccase lignin was slightly lower than in the lignin isolated from original milled *E. globulus* wood. However, the amount of secondary OH increased significantly after the laccase treatment. In addition, the quantity of phenolic OH increased significantly after the steam explosion treatment, which agrees with results found by other authors.^{27,33}

The total amount of β -O-4 structures was significantly reduced after steam explosion treatment, which was in agreement with other papers.^{6,7,13} It is well-known that steam explosion carried out only in the presence of steam is an autohydrolytic process catalyzed by the organic acids formed from the acetylated wood components. The predominant reactions in lignin are fragmentation by acidolysis of β -O-4 linkages and polymerization by acid-catalyzed condensation between the aromatic C₆ or C₅ and a carbonium ion, normally located at α -C of the side chain.¹³ As a result of the substantial cleavage of β -O-4 linkages, the molecular weight of lignin would be expected to decrease sharply as a result of the steam explosion treatment. However, Li et al.¹³ observed a gradual increase in molecular weight with increasing severity of the treatment. Thus, they postulated that the cleavage of β -O-4 linkages in lignin during the steam explosion process was accompanied by a comprehensive repolymerization, resulting in an increase in molecular size and a more heterogeneous lignin structure. In the present study, the steam explosion conditions were milder than those reported before. The repolymerization reaction may not be dominant, and no increase in the degree of condensation (DC) after steam explosion treatment was observed.

After the laccase-mediator treatment, no variation in the total amount of β -O-4 structures was observed, but an increase in the DC was found. In contrast, TGA results indicated a decrease in lignin degradation temperature, which correlates with less

condensed lignin structures. However, it should be noted that milled wood samples and not isolated lignin was used in TGA measurements. Therefore, indirect and collective effects of lignin and other components are factored in the thermal analyses (structural changes). These results indicate a decrease in lignin molecular weight during steam explosion followed by laccase-mediator treatment. This is also supported by the observed higher extractives yield and ASL yield (Table 3) compared to the control sample; also, the lignin isolated from steam-exploded samples had a more condensed structure.

The amount of methoxyl groups (OMe) was reduced from 1.77/Ar to 1.70/Ar after steam explosion treatment and from 1.70/Ar to 1.61/Ar after a subsequent laccase treatment. A similar reduction in methoxyl groups has been observed by Chua and Wayman.²⁹

A slight reduction in S/G ratio was observed after steam explosion treatment and also after laccase-mediator treatment. Chua and Wayman²⁹ explained this reduction in S/G ratio during mild steam explosion condition as being due to an initial preferential removal of syringyl to guaiacyl units at short autohydrolysis times. The decrease in S/G ratio after laccase-mediator treatment was also observed by Ibarra et al.³¹

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: ojrojas@ncsu.edu. Phone: (919) 513-7464. Fax: (919) 515-6302.

Funding Sources

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (FPI fellowship BES2007-14528) is gratefully acknowledged.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Professor M. J. Diaz of Universidad de Huelva (Spain) for assistance with HPLC carbohydrate analyses. We acknowledge the contributions of Prof. F. Somolinos of Universidad Complutense de Madrid (Spain).

ABBREVIATIONS USED

MWL, milled wood lignin; NMR, nuclear magnetic resonance; SEC, size exclusion chromatography; TGA, thermogravimetric analyses; SE, steam exploded; LMS, laccase-mediator system; HBT, 1-hydroxybenzotriazole; ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate); HPLC, high-performance liquid chromatography; DMSO, dimethyl sulfoxide; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; LMS-E, laccase-mediator system treatment followed by alkaline extraction.

REFERENCES

- (1) Zimbardi, F.; Ricci, E.; Braccio, G. Techno-economic study on steam explosion application in biomass processing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98*, 89–99.
- (2) Puls, J.; Poutanen, K.; Körner, H. U.; Viikari, L. Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *22*, 416–423.
- (3) Ramos, L. P.; Breuil, C.; Kushner, D. J.; Saddler, J. N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung* **1992**, *46* (2), 149–154.
- (4) Heitz, M.; Capek-Ménard, E.; Koeberle, P. D.; Gagné, J.; Chorinet, E.; Overend, R. P.; Taylor, J. D.; Yu, E. Fractionation of

Populus tremuloides at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the Stake II technology. *Bioresour. Technol.* **1991**, *35*, 23–33.

(5) Montané, D.; Salvadó, J.; Farriol, X. Fractionation of wheat straw via steam explosion pretreatment. Characteristics of the lignin obtained by alkali delignification of the steamed straw. *Holzforschung* **1997**, *51*, 135–141.

(6) Robert, D.; Bardet, M.; Lapierre, D.; Gellerstedt, G. Structural changes in aspen lignin during steam explosion treatment. *Cell. Chem. Technol.* **1988**, *22*, 221–230.

(7) Jakobsons, J.; Hortling, B.; Erins, P.; Sundquist, J. Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holz-forschung* **1995**, *49*, 51–59.

(8) Josefsson, T.; Lennholm, H.; Gellerstedt, G. Changes in cellulose supramolecular structure and molecular weight distribution during steam explosion of aspen wood. *Cellulose* **2001**, *8*, 289–296.

(9) Josefsson, T.; Lennholm, H.; Gellerstedt, G. Steam explosion of aspen wood. Characterization of reaction products. *Holzforschung* **2002**, *53* (3), 289–297.

(10) Lawoko, M.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. Characterisation of lignin–carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods. *Holzforschung* **2006**, *60*, 156–161.

(11) Balakshin, M. Yu.; Capanema, E. A.; Chang, H.-m. Recent advances in isolation and analysis of lignins and lignin-carbohydrate complexes. In *Characterization of Lignocellulosics*; Hu, T., Ed.; Blackwell: Oxford, U.K., 2008; pp 148–166.

(12) Björkman, A. Studies on finely divided wood. Part I. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidn.* **1956**, *59*, 477–485.

(13) Li, J.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 3061–3068.

(14) Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A.; Kuhad, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 1947–1950.

(15) Jurado, M.; Prieto, A.; Martínez-Alcalá, Á.; Martínez, A. T.; Martínez, M. J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (24), 6378–6384.

(16) Martín-Sampedro, R.; Eugenio, M.; Carbajo, J.; Villar, J. Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* Kraft pulping. *Bioresour. Technol.* **2011**, *102* (14), 7183–7189.

(17) Overend, R. P.; Chornet, E. Fractionation of lignocellulosics by steam-liquefaction pretreatments. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1987**, *A321*, 523–536.

(18) Capanema, E. A.; Balakshin, M. Yu.; Kadla, J. F.; Chang, H.-m. On isolation of milled wood lignin from eucalyptus wood. *O Papel* **2007**, No. (N5), 74–79.

(19) Capanema, E. A.; Balakshin, M. Yu.; Kadla, J. F. A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1850–1860.

(20) Garrote, G.; Dominguez, H.; Parajo, J. C. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1999**, *74*, 1101–1109.

(21) Capanema, E. A.; Balakshin, M. Yu.; Kadla, J. F. Quantitative characterization of a hardwood milled wood lignin by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9639–9649.

(22) Rovira, P.; Vallejo, V. R. Examination of thermal and acid hydrolysis procedures in characterization of organic matter. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **2000**, *31* (1–2), 81–100.

(23) Barneto, A. G.; Ariza, K.; Martin, J. E.; Jiménez, L. Use of autocatalytic kinetics to obtain composition of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100*, 3963–3973.

(24) Turi, E. A. *Thermal Characterization of Polymeric Materials*; Academic Press: New York, 1981.

(25) Reh, U.; Kraepelin, G.; Lamprecht, I. Use of differential scanning calorimetry for structural analysis of fungally degraded wood. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52* (5), 1101–1106.

(26) Balakshin, M.; Capanema, E.; Gracz, H.; Chang, H.-m.; Jameel, H. Quantification of lignin–carbohydrate linkages with high resolution NMR spectroscopy. *Planta* **2011**, *233*, 1097–1110.

(27) Robert, D.; Gellerstedt, G.; Bardet, M. Carbon-13 NMR analysis of lignins obtained after sulfonation of steam exploded aspen wood. *Nordic Pulp Pap. Res. J.* **1986**, *1*, 18–25.

(28) Lora, J. H.; Wayman, M. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. *Tappi* **1978**, *61* (6), 47–50.

(29) Chua, M. G. S.; Wayman, M. Characterization of autohydrolysis aspen (*P. tremuloides*) lignin. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin. *Can. J. Chem.* **1978**, *57*, 1141–1149.

(30) Balakshin, M. Yu.; Capanema, E. A.; Chen, C.-L.; Gratzl, J. S.; Kirkman, A. G.; Gracz, H. S. Biobleaching of pulp with dioxygen in the laccase-mediator system – reaction mechanisms for degradation of residual lignin. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *13*, 1–16.

(31) Ibarra, D.; Chavez, M. I.; Rencoret, J.; del Rio, J. C.; Gutierrez, A.; Romero, J.; Camarero, S.; Martínez, M. J.; Jimenez-Barbero, J.; Martínez, A. T. Structural modification of eucalypt pulp lignin in a totally chlorine-free bleaching sequence including a laccase-mediator stage. *Holzforschung* **2007**, *61*, 634–646.

(32) Evtuguin, D. V.; Pascoal Neto, C.; Silva, A. M. S.; Dominges, P. M.; Amado, F. M. L.; Robert, D.; Faix, O. Comprehensive study on the chemical structure of dioxane lignin from plantation *Eucalyptus globulus* lignin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4252–4261.

(33) Shimizu, K.; Sudo, K.; Ono, H.; Ishihara, M.; Fujii, T.; Hishiyama, S. Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. *Biomass Bioenerg.* **1998**, *14* (3), 195–203.

PUBLICACIÓN III:

Steam explosion and enzymatic treatments as pre-treatments to improve enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., García, J.C., Lopez, F., Villar, J.C., Diaz, M.J.R.

Manuscrito

Steam explosion and enzymatic as pre-treatments to improve enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus globulus*

Martín-Sampedro, R.^a; Eugenio, M.E.^a; García, J.C.^b; Lopez, F.^b, Villar, J.C.^a and Diaz, M.J.^{b*}

^a *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA. Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040, Madrid (Spain)*

^b *Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Huelva. Campus el Carmen, 21071, Huelva (Spain)*

*Correponding Author: dblanco@uhu.es. Telephone number: (+34) 959219990; Fax number: (+34) 959218778

Abstract

Eucalyptus globulus wood chips were subjected to several steam explosion treatments in order to evaluate the effect of the operational conditions on a subsequent enzymatic hydrolysis. Steam explosion resulted in the enhancement of the enzymatic hydrolysis of the solid fraction. A laccase-mediator system (LMS) treatment, prior to the enzymatic hydrolysis, increased the glucose yield from 24.7 to 27.1 %, probably as a result of the detoxification of the substrate. However, when xylanase was used to boost the LMS treatment, the hydrolysis rates did not improve. In order to assess the total amount of sugars obtainable from *E. globulus*, the liquid fraction obtained from the steam explosion was subjected to hydrolysis too. The enzymatic hydrolysis of this fraction turned out to be more efficient than the acid hydrolysis, breaking down 82.7% of the xylooligosaccharides into xylose units. An overall yield of 210g of sugars from 1 kg of raw material was achieved.

Keywords

Eucalyptus globulus, steam explosion, enzymatic hydrolysis, laccases, xylanases, bioethanol production.

1. Introduction

Biorefinery is a general concept which refers to an integrated and diversified processing plant where biomass feedstocks are converted into a wide range of valuable products, including fuels, power, heat, chemicals and materials [1,2]. Lignocellulosic materials are considered a renewable resource of biomass to be used in the biorefinery and to produce ethanol from their sugars. As a preliminary step, these materials are normally subjected to a pre-treatment that removes physical and chemical impediments to subsequent steps such as enzymatic hydrolysis and fermentation. These pre-treatments must improve the formation of sugars, avoid the degradation or loss of carbohydrates and the formation of inhibitory products and, last but not least, be cost-effective [3]. Among the different existing pre-treatments, steam explosion is one of the most commonly used. The steam explosion process entails exposing the lignocellulosic material to high-pressure steam, followed by a rapid decompression, which forces the fibrous material to “explode” into separated fibers and fiber bundles [4]. During this process, the high-temperature steam leads to the release of acids from the acetylated wood components which catalyze hydrolytic reactions in the wood polymers [5-8]. These autohydrolysis reactions result in a loss of hemicellulose, which is dissolved in hot water and can be recovered in the liquid fraction to be further converted, as already mentioned, into value-added products such as ethanol [9].

The main advantages of the steam explosion process are a significantly lower environmental impact, lower capital investment and less hazardous chemicals released in the process [10] in comparison with other pre-treatments. However, the degradation of sugars and lignin during steam explosion is unavoidable, releasing degradation products which can negatively impact further steps of the process [3,11,12]. To remove these inhibiting products, several treatments have been assayed, including physical, chemical and biological methods [13,14]. The application of the enzyme laccase is one of the new biological methods used to clear inhibitors, as these enzymes are capable of removing specifically phenolic compounds present in the biomass [15-18]. Moreover, as the solid fraction resulting from the steam explosion process (exploded chips) shows a more open structure compared with non-exploded chips [19], laccases have greater accessibility to the steam exploded chips and the efficacy of the process increases [3, 16, 20-23].

Additionally, xylanases are known to enhance the effect of laccases in some applications. Thus, Valls and Roncero [24] have observed that, when a xylanase treatment precedes the laccase treatment in the bleaching of crude eucalyptus kraft pulps, the amount of residual lignin and hexenuronic acids is smaller than when pulps are bleached using a laccase step alone.

Whereas a few studies have reported on the use of steam explosion together with a laccase treatment to improve ethanol production from lignocellulosic materials, none of them has evaluated the use of a xylanase to boost the laccase effect. Thus, the aim of our study was not only to evaluate the different fractions obtained after applying steam explosion and a laccase treatment to the production of ethanol, but also to assess the contribution to the whole process of adding a xylanase treatment prior to the laccase step. To that end, an acid or enzymatic hydrolysis was assayed over all fractions obtained in the different steps. Sugars content before and after the hydrolysis, i.e. the hydrolysis yield, was determined.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials and chemicals

Eucalyptus globulus chips (EG) were kindly supplied by La Montañanesa pulp mill (Torraspapel group, Spain). The chemical composition of the chips was: 0.7 % ethanol extractives, 20.6 % Klason lignin, 4.8 % acid soluble lignin, 46.0 % glucan, 15.6 % xylan, 0.24 % arabinan and 4.1 % acetyl groups.

All chemicals used were reagent-grade and were acquired from Merck (Barcelona, Spain), Panreac (Barcelona, Spain) or Sigma–Aldrich (Madrid, Spain), except for 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS), which was purchased from Roche (Madrid, Spain).

2.2. Steam explosion pre-treatments

The steam explosion treatments were performed in a 26 liter stainless steel digester connected to a blowing (expansion) tank. The temperature inside the digester was kept constant at 183°C (10 kg cm⁻²) by adding steam, and at the end of the

treatment, the pressure was reduced to 6 kg cm⁻² and the chips were discharged into the blowing tank at atmospheric pressure. The steam explosion variables were the number of cycles and the duration of the first cycle (the second cycle had a fixed duration of 3 minutes). Addition of a pre-extraction step (immersion of the chips in water for 16 hours at 25°C) prior to steam explosion was also evaluated in order to study the effect of water impregnation. The operational conditions applied were based on previous work [4,19] and are summarized in Table 1.

The severity factor of each treatment was calculated according to the following equation defined by Overend and Chornet [25].

$$S_0 = \log \left(e^{\frac{T-100}{14.75}} \cdot t \right) \quad (1)$$

where T is the temperature (°C) and t the duration of the treatment (min).

2.3. Enzymatic hydrolysis of solid fractions obtained after the several steam explosion treatments

The solid fractions resulting from all steam explosion pre-treatments (Table 1) were ground in a Wiley mill to pass through a 1 mm screen. Wood meals obtained were then subjected to enzymatic hydrolysis by action of a cellulolytic complex (Celluclast 1.5L), supplemented with β-glucosidase (Novozym 188) at a 1:3 ratio [11]. Both enzymatic mixtures were kindly provided by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark). The celluclast 1.5 L dose was 20 EGU g⁻¹ of substrate (at 40°C and pH 6.0). The enzymatic hydrolysis treatments were carried out at pH 4.8 (50 mmol L⁻¹ citrate – phosphate buffer) and 50°C (according to the specifications listed in the product sheet) in a rotary shaker (150 revolution per minute) for 72 h with 5 % concentration of the pre-treated material. After enzymatic hydrolysis, samples were heated in boiling water for 5 min and, after cooling, centrifuged to separate the hydrolysate and the solid residues. The yield of the treatment and the sugars content (as per the method described in section 2.6.) of all liquid and solid fractions were determined. The steam explosion pre-treatment which proved to be most efficient was selected for further assays (see Figure 1).

2.4. Laccase and xylanase pre-treatments of the solid fraction obtained from the selected steam explosion pre-treatment

The solid fraction obtained from the selected steam explosion pre-treatment was subjected to the xylanase and/or laccase treatment before the enzymatic hydrolysis. These enzymatic treatments were carried out in sequence or separately (Figure 1). The enzymes used were Pulpzyme HC (xylanase) and Novozym 51003 (laccase) produced by submerged fermentation of genetically modified *Bacillus* sp. and *Aspergillus* sp., respectively. Both enzymes were donated by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

Assays were performed in 500-mL flasks placed in a thermostatic shaker at 100 revolutions per minute. Based on the enzyme product sheets provided by the manufacturer, 65°C and pH 6.5 and 70°C and pH 6 were the conditions selected to perform the xylanase and laccase treatments, respectively. Both treatments used a 7 % substrate concentration, for 30 min and 100 mmol L⁻¹ phosphate buffer. The xylanase and laccase doses were 50 AXU g⁻¹ of substrate and 30 U laccase g⁻¹ of substrate, respectively. For the laccase treatments, flasks were equipped with an air bubbling system, and 5 mmol L⁻¹ 1-hydroxybenzotriazole (HBT) was used as mediator.

After the enzymatic treatments, the solid fractions were isolated and subjected to an enzymatic hydrolysis according to the method described in section 2.3.

2.5. Hydrolysis of the liquid fraction obtained from the selected steam explosion treatment

The liquid fractions obtained from the selected steam explosion pre-treatment were subjected to both acid and enzymatic hydrolysis. Acid hydrolysis was carried out with 2 % H₂SO₄ at 115°C for 60 min in an autoclave, based on Garrote et al. [26], to avoid degradation of the monomers. Enzymatic hydrolysis was performed at pH 6.3 and 50°C in a rotary shaker (150 revolutions per minute) for 72 h. According to Um and van Walsum [27], a mixture of commercial enzyme preparations increases the hydrolysis rate of xylan-rich extracts; therefore a combination of cellulolytic complex (Celluclast 1.5L) and xylanase (Pulpzyme HP) was used at a 3:1 ratio. The Pulpzyme dose was 150 AXU ml⁻¹ of sample. After the enzymatic hydrolysis, samples were heated in boiling water for 5 min and then cooled at room temperature.

Finally, the sugar contents of the hydrolysates obtained from both hydrolysis processes were determined as per the method described in section 2.6.

2.6. Analysis

The composition of the raw material (EG) and all solid fractions was determined by standard analytical methods. The extractives were determined as the soluble material after a Soxhlet extraction with ethanol for 6 hours. The free-extractive samples were subjected to quantitative acid hydrolysis to determine the carbohydrate composition. This acid hydrolysis was performed in two steps according to Garrote et al. [28]. The hydrolysed liquid obtained was then analysed for sugars and acetyl group contents by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using the Agilent Technology 1200 series RID with an Aminex HPX-87H column operated at 50°C with a mobile phase containing 5 mmol L⁻¹ sulfuric acid pumped at a rate of 0.6 ml min⁻¹. The solid residue remaining after the acid hydrolysis is considered acid insoluble lignin (Klason lignin). Additionally, the acid soluble lignin was quantified using UV spectrophotometry at 205 nm.

The compositions of the liquid fractions obtained during the experiments described in sections 2.3 and 2.5 were also determined. An aliquot (1 ml) was filtered through 0.45 µm membranes and used for direct HPLC determination of monosaccharides, acetic acid, furfural and hydromethylfurfural. A second aliquot of 25 ml was subjected to quantitative posthydrolysis with 4 % H₂SO₄, at 120°C, for 60 min, before HPLC analysis. Increments in the concentrations of monosaccharides and acetic acid caused by posthydrolysis were used to measure the concentrations of oligomers and acetyl groups bound to oligosaccharides, respectively [28].

2.7. Statistical analysis

All treatments were run twice and samples for chemical analysis were triplicated. Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$) was used to determine which means, among a set of means, differ from the rest (Matlab 5.1).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effects of steam explosion on the chemical composition of *Eucalyptus globulus*.

The effects of steam explosion on the obtained solid fractions are indicated by the data in Table 2. The pre-extraction of EG did not affect significantly the chemical composition of the chips (EG and SE0 samples), apart from a reduction in the soluble lignin content. However, significant differences between the EG and the rest of the steam exploded samples (SE1-SE8) were found for all evaluated parameters except for acetyl groups (with the exception of SE4).

Steam explosion removes hemicelluloses and also some lignin depending on the extent of the treatment. This has been previously described by Excoffier et al. [5] who have found that, whereas the hemicellulose is removed by hydrolysis, lignin softens under the heat and slowly depolymerizes. In general, the pre-extraction did not affect the solid content under lower severity factors (SE1-SE2 or SE5-SE6). However, under the more severe treatments, significant differences were observed (SE3-SE4, SE7-SE8) mainly in yield and extractable values. The greatest differences among treatments were observed for SE3 and SE4. These treatments have a medium-high severity factor and a single cycle, though the duration of this cycle is long. These data suggest that cycle duration is a major factor that could influence the extraction of the EG components.

Ethanol extractives were significantly different amongst treatments (mainly in SE4 and SE8). As far as the Klason lignin content is concerned, although it was smaller in the exploded samples than in controls (with the exception of SE3), it was similar for all the different treatments. However, as expected, higher solubilization of hemicelluloses meant that the xylan content of the solid fractions decreased as the intensity of the treatment increased. On the other hand, it should be noted that the highest content of glucan found in steam-explosion treated samples was a relative increase caused by the fact that cellulose remained almost unaffected under those conditions while hemicelluloses and some lignin were removed from the solid fractions [29].

Based on treatment yield and baseline chemical composition, it is possible to determine what percentage of each wood component remains in the solid fraction after treatment of the raw material (Fig. 2). Thus, hemicelluloses underwent a progressive

solubilization after steam explosion: xylans and arabinans remaining in the solid fraction decreased down to 53.4 % and 6.6 %, respectively, in SE8. Similar findings have been reported by Ruiz et al. [3] who have described a complete solubilization of arabinan and a solubilization of a fraction of 50 % of the original xylan after subjecting sunflower stalks to steam explosion at 190°C. Acetyl groups, bound to the xylan in the native wood, were also removed during medium and severe steam explosion treatments (SE4-SE8). Other authors have observed also a similar removal during steam explosion and autohydrolysis of hardwood [6]. Acetyl groups can be removed from the wood by means of two different reaction pathways: direct hydrolysis of acetyl groups from the solid xylan backbone and dissolution of acetylated xylo-oligosaccharides [30]. Lignin is partially dissolved also whereas glucan stays unchanged. Other authors have reported a slight solubilization of glucan, but mostly after more severe treatments than those reported here [3,7,8].

3.2. Effects of steam explosion on the enzymatic hydrolysis of the solid fractions.

After the steam explosion treatments, the solid fractions were subjected to enzymatic hydrolysis. The chemical characterization of the solid and liquid fractions obtained after these treatments is shown in Tables 3 and 4, respectively. A decrease in the extractives and sugar contents of the solid fraction were evident, being higher for exploded samples that had been exposed to more intensive steam explosion. Enzymatic hydrolysis is known to accelerate the extraction of soluble and relatively easily biodegradable organic products [31]. This solubilization and hydrolysis caused an increase in the relative content of Klason lignin in all samples after enzymatic hydrolysis.

As Table 4 shows, all hydrolysis conditions assayed produced mainly monosaccharides, since oligomer concentrations were low in all liquid fractions. The hydrolysis yield can be determined from monomers concentrations and the sugars content of the solid fractions before the enzymatic treatment (Figure 3). For non-exploded samples (EG-SE0) similar glucose and total sugars yields were observed (14-15 %). In the exploded samples, hydrolysis of xylan took place also, resulting in higher total sugar yields compared to glucose yields. Furthermore, more intensive steam explosion pre-treatments resulted in higher hydrolysis yields. This finding has been reported by other authors and has been attributed to the increased porosity and the

removal of hemicelluloses which increase the accessibility to cellulose [20-22]. Additionally, it is well recognized in the literature that the lignin content has an impact on the enzymatic hydrolysis [32,33]. Nevertheless, the differences observed in the hydrolysis yield could be due to the severity of the steam explosion pre-treatment but not to variations in the lignin content, since differences in lignin content were barely significant.

The highest hydrolysis yields were obtained in samples subjected to the longest steam explosion treatments after water pre-extraction (24.1 % and 24.7 % glucose yields and 35.8 % and 35.6 % total sugar yields for SE4 and SE8 respectively). Other authors have reported slightly higher hydrolysis yields after steam explosions whose severity was comparable to those performed in this study. Thus, glucose yields of 31 %, 32 % and 35 % have been reported by Varga et al. [23] with corn stover (steam explosion at 190°C, 5 min, severity factor of 3.35), Ruiz et al. [3] with sunflower stalk (180-190°C, 5 min, $S_0 = 3.35-3.64$) and Jurado et al. [16] with wheat straw (190°C, 10 min, $S_0 = 3.65$), respectively. However, these authors have used non-wood materials, which have a more porous and readily accessible tissue structure [34] that can facilitate the enzymatic treatment. Reports of higher hydrolysis yields for eucalyptus consistently use higher severity factors and/or the addition of a catalytic acid [11,35]. However, if the severity or acidity of the pre-treatment were too high, greater degradation of carbohydrates during steam explosion would result in less glucose recovery and more inhibitors present in both the solid and liquid fractions [3,11,12]. In our case, the overall yield of glucose and total sugars with respect to the original raw material (EG) were 23.7 % and 30.2 % respectively, with the most severe pre-treatment (SE8). Furthermore, the real total sugar yield was higher than this value because sugar recovery in the liquid fraction after steam explosion should be taken into account as well (see section 3.4).

In view of the difficulty of finding microorganisms capable of fermenting both cellulose and xylose with high yield [36,37], the glucose yield, but not the total sugar yield, has been considered to identify the most efficient pre-treatment for enzymatic hydrolysis of the solid fraction. Consequently, the SE8 pre-treatment turned out to be the most efficient, and both the solid and liquid fractions obtained after this pre-treatment were subjected to further hydrolysis tests.

3.3. Effects of the laccase and xylanase pre-treatments on the enzymatic hydrolysis of the exploded solid fractions.

SE8 was subjected to xylanase and/or laccase treatments in order to study their effect on the enzymatic hydrolysis performed subsequently. The chemical composition of the resulting samples is shown in Table 5. Comparing the chemical composition of the samples after the laccase treatment (SE8-L) with that of SE8, a decrease in ethanol extractives was observed. This finding could be related with the removal of lipophilic extractives by the laccase, which has been reported by several authors using laccase to combat pitch problems in pulp and paper production [38-40]. Also, a decrease in xylan and acetyl groups was found after the enzymatic treatments. Consequently, an increase in the relative percentage of glucan and Klason lignin was observed. The removal of these products was likely the result of partial degradation during steam explosion and the extractive effect of the subsequent enzymatic treatment at high temperature (70°C). Although the LMS treatment has been combined with an alkaline extraction stage to efficiently delignify pulps and lignocellulosic materials [41,42], no reduction in Klason lignin was observed here. This result might indicate that LMS did oxidize the lignin, but the resulting products were not soluble at the pH of treatment (pH 6), and a subsequent alkaline treatment would be needed to remove the oxidized products [40]. After the xylanase treatment (SE8-X) reduction of the xylan content was greater and reduction of acetyl groups was smaller. However, after sequential xylanase and laccase treatments no significant differences in chemical composition were found with respect to the laccase treatment, apart from a higher content of acetyl groups.

After the enzymatic hydrolysis of the treated samples, a reduction in both glucan and xylan content was observed (Table 5), secondary to the degradation of cellulose and hemicelluloses. Thus, glucose and xylose monomers were the main components of the hydrolysates, as Table 6 shows.

Figure 4 shows the glucose and total sugar yield of the enzymatic hydrolysis. As it can be observed, the LMS treatment increased the glucose yield compared to SE8 (27.1 % vs 24.7 %), although the total sugar yield was slightly smaller. An increase in the hydrolysis yield has been made evident also by other authors after laccase and white rot fungus treatments [43,44]. This can be a result of the modification of lignin by the laccase, probably decreasing the hydrophobicity of lignin and eventually changing the

polarity characteristics of the surface, which in turn may have decreased the irreversible, unproductive binding of cellulases to lignin [17]. However, although Jurado et al. [16] have reported no effect of LMS on the hydrolysis rate, these authors have found an increase in ethanol production in a subsequent fermentation, owing to the removal of inhibiting products (phenolic compounds) during the LMS treatment of steam exploded wheat straw.

The xylanase treatment also increased the glucose yield (28.3 %), although this treatment did not enhance the effect of the LMS treatment in the enzymatic hydrolysis (SE8-XL). However, lack of improvement of the hydrolysis does not mean lack of beneficial effects on a subsequent fermentation process, as mentioned above [16]. Therefore, a fermentation process should be carried out in order to clarify the effect of the laccase and the xylanase-laccase treatments on bioethanol production.

On the other hand, the beneficial effect of the xylanase treatment on the glucose yield could be related to greater accessibility gained by the removal of xylan, as it could be observed also after the steam explosion treatments. Nevertheless, the overall glucose yield of the process, taking into account both the steam explosion and the xylanase treatment yields, was found higher than that of the SE8 sample (27.8 % vs 23.7 %), while the overall total sugar yield was slightly lower (29.6 % vs 30.2 %).

3.4. Hydrolysis of the liquid fraction obtained after the steam explosion treatment selected as most effective

Two liquid fractions were isolated from the SE 8 treatment, one in each cycle. The sugar content of these fractions is listed in Table 7. This table also presents the percentage of sugar recovery, determined from the sugar concentrations in the liquid and the potential sugar concentration of the original raw material (EG). It should be noted that, in the first SE cycle, 8.2 % of xylose and 4.0 % of glucose were recovered in the liquid fraction as oligosaccharides. In the second cycle, a higher amount of xylooligosaccharides was recovered, even when this cycle was shorter than the first one (3 min vs 10 min). This result can indicate that, during the first steam explosion treatment, some carbohydrates were degraded partially but not completely solubilized in the liquid fraction, requiring a longer treatment or a second cycle to be completely solubilized. Furthermore, the decompression in the first cycle resulted in physical

rupture of the fiber walls and chip structure, which is likely to have enhanced the subsequent extraction of hemicelluloses in the second cycle. The total xylose recovery in the two liquid fractions was smaller than that estimated based on the extraction of hemicelluloses in the solid fraction (25.3 % vs 46.6 %). The reason could be an inefficient recovery of the extracted hemicelluloses since part of them could be dissolved in the liquid that impregnates the chips after the explosion and is discarded after washing the exploded chips. Another reason could be the degradation of the dissolved xylooligosaccharides to furfural, which has been reported by other authors during steam explosion with high severity factor [7,11]. However, in the liquid fractions obtained in our study, neither furfural nor hydroxymethyl furfural (HMF) was detected in the HPLC analysis, indicating that hydrolysis reactions largely predominated over degradation reactions. Nevertheless, it is possible that these volatile products were not quantitatively recovered in the liquid fraction because they were partially lost to the atmosphere after explosive decompression [35].

Conversion of recovered oligosaccharides into monomers, a process which could be of use in bioethanol production, was evaluated by acid and enzymatic hydrolysis. Figure 5 shows the glucose and xylose hydrolysis yields for enzymatic and acid hydrolysis of the two liquid fractions. Total hydrolysis yields (according to the sum of monomers in the two liquid fractions) were determined for enzymatic and acid hydrolysis.

The xylose hydrolysis yields for both the acid and the enzymatic process were the lowest in the liquid fraction obtained from the second cycle (SE8.2). Contrary to this, the glucose hydrolysis yields were the lowest in SE8.1. A plausible explanation for this can be the differences in the concentration of substrates to be hydrolyzed (oligosaccharides). Thus, for lower initial concentrations, the hydrolysis yields were higher. However, the total amounts converted into glucose, in SE8.1, and xylose, in SE8.2, were higher than in SE8.2 and SE8.1 respectively. Therefore, the observed reductions in the hydrolysis yield could be a consequence of the increased initial amount of oligosaccharides (which is in the denominator in the yield equation).

The total hydrolysis yields from the acid hydrolysis were lower than those obtained from the enzymatic hydrolysis: 16.5 % vs 65.3 % for glucose and 61.4 % vs 82.7 % for xylose. However, the acid hydrolysis was not optimized, and an increase in

reaction time, temperature and/or acid concentration could increment its yield. Nevertheless, raising these operational conditions would also enhance degradation of monosaccharides, increasing the amount of inhibitors such as furfural and HMF [2,26]. On the other hand, the enzymatic hydrolysis yield could be increased also by modifying the enzyme-substrate ratio and the enzyme activity. Thus, the enzymatic hydrolysis has the advantage of requiring less severe operational conditions (temperature, pH), generating less inhibiting products, which would contribute to a greater bioethanol production rate [27].

Nevertheless, during the steam explosion pre-treatment, the degradation of sugars and lignin could generate inhibitors, as it has been mentioned above [3]. As these inhibitors are mainly hydrosoluble products, the liquid fraction obtained in this pre-treatment, is expected to have a higher concentration of toxic products, including free phenols [16]. Therefore, the detoxification of this fraction, before or after the hydrolysis, could result in a greater fermentation yield. To this end, several detoxification methods can be used, being one of the most promising the LMS treatments [17,18]. The use of a less intensive steam explosion pre-treatment, as those performed in this study, could be an alternative option to reduce the inhibiting products. Furthermore, the development of pentose fermenting yeasts, capable of achieving high bioethanol production rates and of tolerating high ethanol concentrations and also small amounts of inhibitors, is of great interest for the utilization of these hydrolysates [45].

3.5. Overall hydrolysis yields

In order to optimize the overall process, several goals should be set. Recovery of both cellulose, in the solid fraction, and hemicelluloses, in the liquid fraction, is important in the steam explosion pre-treatment. The amount of inhibitors generated during this pre-treatment, and the hydrolysis yields of both the solid and the liquid fractions are also critical factors to be considered [3]. Accordingly, the overall yields of the process were determined including all these considerations.

Taking into account that 25.3 % of the total xylan content in the original wood (EG) was recovered as xylooligosaccharides in the liquid fractions, the enzymatic hydrolysis rate with respect to the xylan present in EG was 21.0 %. Thus, the overall xylose yield obtained after the enzymatic hydrolysis of both the solid and the liquid

fractions (section 3.2 and 3.4, respectively) in SE8 was 55.5 % of the hemicelluloses contained in EG (8.6 % of the whole raw material). However, this yield could be increased if recovery of extracted hemicelluloses was more efficient, as around 20 % of the hemicelluloses were lost. On the other hand, the overall glucose yield, including the enzymatic hydrolysis of the solid and the liquid fractions, was 26.8 % of the glucose present in EG (12.3 % of the whole raw material); therefore, 210 g of total sugars could be obtained from 1 kg of EG, and this yield could be increased by introducing some modifications in the process, such as laccase detoxification, and improvements in the recovery of the liquid fraction in SE, as it has been mentioned before. Nevertheless, a similar overall yield (22 %) was obtained using sunflower stalks and a more severe steam explosion pre-treatment [3], which could produce more inhibiting products and also increase the operational cost of the pre-treatment.

4. Conclusions

Steam explosion has demonstrated to be an efficient pre-treatment to enhance the enzymatic hydrolysis of *E. globulus* wood. In order to optimize the overall process, hydrolysis of glucose in the solid fraction and of hemicelluloses in the liquid fraction should be optimized. Reported results showed that a high severity SE pre-treatment is not recommended, as hemicelluloses are lost and inhibitors are generated in the process. Thus, two cycles of steam explosion (10+3 min) at 183°C were enough to obtain 210g of total sugars from 1kg of raw material. Moreover, this yield could be increased by introducing some modifications in the process, such as laccase detoxification and improvements in the recovery of the liquid fraction during steam explosion.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via the Projects CTQ 2006-00385 and CTQ 2009-11268 and the FPI fellowship (BES2007-14528).

References

- [1] Carvalho F, Duarte LC, Girio FM. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res India* 2008;67:849-64.
- [2] Um BH, van Walsum GP. Acid hydrolysis of hemicellulose in green liquor pre-pulping extract of mixed northern hardwoods. *Appl Biochem Biotech* 2009;153(1):127-38.
- [3] Ruiz E, Cara C, Manzanares P, Ballesteros M, Castro E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb Tech* 2008;42(2):160-6.
- [4] Martín-Sampedro R, Eugenio ME, Revilla E, Martín JA, Villar JC. Integration of kraft pulpin on a biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment. *BioResources* 2011;6:513-28.
- [5] Excoffier G, Peguy A, Rinaudo M, Vignon M. Evolution of lignocellulosic components during steam explosion. Potential applications. *International workshop of steam explosion techniques: Fundamentals and industrial applications*: Routledge; 1991, p.83-95.
- [6] Leschinsky M, Sixta H, Patt R. Detailed mass balances of the autohydrolysis of *Eucalyptus globulus* at 170 degrees C. *BioResources* 2009;4(2):687-703.
- [7] Li J, Henriksson G, Gellerstedt G. Carbohydrate reactions during high-temperature steam treatment of aspen wood. *Appl Biochem Biotech* 2005;125(3):175-88.
- [8] Tunc MS, Lawoko M, van Heiningen A. Understanding the limitations of removal of hemicelluloses during autohydrolysis of a mixture of southern hardwood. *BioResources* 2010;5(1):356-71.
- [9] Li H, Saeed A, Jahan MS, Ni Y, van Heiningen A. Hemicellulose removal from hardwood chips in the pre-hydrolysis step of the kraft-based dissolving pulp production process. *J Wood Chem Technol* 2010;30(1):48-60.

- [10] Li J, Henriksson G, Gellerstedt G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour Technol* 2007;98(16):3061-8.
- [11] Ramos L, Breuil C, Kushner D, Saddler J. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung* 1992;46(2):149-54.
- [12] Wu MM, Chang K, Gregg DJ, Boussaid A, Beatson RP, Saddler JN. Optimization of steam explosion to enhance hemicellulose recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. *Appl Biochem Biotechnol* 1999;77(1):47-54.
- [13] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol* 2000;74(1):25-33.
- [14] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol* 2000;74(1):17-24.
- [15] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, Kuhad RC. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour Technol* 2007;98(10):1947-50.
- [16] Jurado M, Prieto A, Martínez-Alcalá Á, Martínez AT, Martínez MJ. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. *Bioresour Technol* 2009;100(24):6378-84.
- [17] Palonen H, Viikari L. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol Bioeng* 2004;86(5):550-7.
- [18] Martin C, Galbe M, Wahlbom CF, Hahn-Hägerdal B, Jönsson LJ. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* 2002;31(3):274-82.
- [19] Martín-Sampedro R, Eugenio M, Carbajo J, Villar J. Combination of Steam Explosion and Laccase-Mediator Treatments Prior to *Eucalyptus globulus* Kraft Pulping. *Bioresour Technol* 2011;102(14):7183-9.

- [20] Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabañas A, Manzanares P, Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotech* 2006;130(1):496-508.
- [21] Donaldson L, Wong K, Mackie K. Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Sci Technol* 1988;22(2):103-14.
- [22] Yang B, Wyman CE. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol Bioeng* 2004;86(1):88-98.
- [23] Varga E, Réczey K, Zacchi G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl Biochem Biotechnol* 2004;114(1):509-23.
- [24] Valls C, Roncero B. Using both xylanase and laccase enzymes for pulp bleaching. *Bioresour Technol* 2009;100(6):2032-9.
- [25] Overend R, Chornet E, Gascoigne J. Fractionation of Lignocellulosics by Steam-Aqueous Pretreatments. *Philos Trans R Soc London Series A* 1987;321(1561):523-36.
- [26] Garrote G, Dominguez H, Parajó JC. Generation of xylose solutions from *Eucalyptus globulus* wood by autohydrolysis-posthydrolysis processes: posthydrolysis kinetics. *Bioresour Technol* 2001;79(2):155-64.
- [27] Um BH, van Walsum GP. Evaluation of Enzyme Mixtures in Releasing Fermentable Sugars from Pre-pulping Extracts of Mixed Northeast Hardwoods. *Appl Biochem Biotech* 2010;161(1):432-47.
- [28] Garrote G, Dominguez H, Parajó JC. Mild autohydrolysis: an environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *J Chem Technol Biotechnol* 1999;74(11):1101-9.
- [29] Josefsson T, Lennholm H, Gellerstedt G. Changes in cellulose supramolecular structure and molecular weight distribution during steam explosion of aspen wood. *Cellulose* 2001;8(4):289-296.

- [30] Maloney MT, Chapman TW, Baker AJ. Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetics studies of xylan and acetyl group hydrolysis. *Biotechnol Bioeng* 1985;27(3):355-61.
- [31] Lee Y, Chung Y, Jung J. Effects of chemical and enzymatic treatments on the hydrolysis of swine wastewater. *Water Sci Technol* 2008;58(7):1529-34.
- [32] Mooney CA, Mansfield SD, Touhy MG, Saddler JN. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresour Technol* 1998;64(2):113-9.
- [33] Vinzant TB, Ehrman CI, Adney WS, Thomas SR, Himmel ME. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated hardwoods. *Appl Biochem Biotechnol* 1997;62(1):99-104.
- [34] Alaejos J, Lopez F, Eugenio ME, Fernandez M. Non-wood raw materials for pulp and paper making. A review. *Afinidad* 2004;61(513):400-10.
- [35] Emmel A, Mathias AL, Wypych F, Ramos LP. Fractionation of Eucalyptus grandis chips by dilute acid-catalysed steam explosion. *Bioresour Technol* 2003;86(2):105-15.
- [36] Duff SJB, Murray WD. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresour Technol* 1996;55(1):1-33.
- [37] Tomás-Pejó E. Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas de proceso. Doctoral Thesis. Universidad Complutense de Madrid; 2010.
- [38] Widsten P, Kandelbauer A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb Technol* 2008;42(4):293-307.
- [39] Gutiérrez A, Rencoret J, Ibarra D, Molina S, Camarero S, Romero J, et al. Removal of lipophilic extractives from paper pulp by laccase and lignin-derived phenols as natural mediators. *Environ Sci Technol* 2007;41(11):4124-9.
- [40] Zhang X, Renaud S, Paice M. The potential of laccase to remove extractives present in pulp and white water from TMP newsprint mills. *J Pulp Pap Sci* 2005;31(4):175-80.

- [41] Eugenio M, Santos S, Carbajo J, Martín J, Martín-Sampedro R, González A, et al. Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour Technol* 2010;101(6):1866-70.
- [42] Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, Sabharwal N, Singh R. Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World J Microb Biotechnol* 2008;24(12):2799-2804.
- [43] Dias AA, Freitas GS, Marques GSM, Sampaio A, Fraga IS, Rodrigues MAM, et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. *Bioresour Technol* 2010;101(15):6045-50.
- [44] Wan CX, Li YB. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme Microb Technol* 2010;47(1-2):31-6.
- [45] Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microb Biotechnol* 2007;74(5):937-53.

Figure captions

Figure 1. Block diagram of assays performed: First, selection of the most efficient steam explosion pre-treatment (1); and then, study of the effect of xylanase and laccase on the enzymatic hydrolysis of the solid fraction, and evaluation of acid and enzymatic hydrolysis of the liquid fraction (2).

Figure 2. Percentage of each wood component remaining in the solid fraction after each steam explosion treatment, compared to the original amount of these components in the raw material (EG).

Figure 3. Glucose and total sugar yields during enzymatic hydrolysis of the solid fractions obtained after steam explosion treatments.

Figure 4. Glucose and total sugar yields during enzymatic hydrolysis of the solid fractions obtained after steam explosion and laccase/xylanase treatments.

Figure 5. Glucose and xylose yields during enzymatic hydrolysis (EH) and acid hydrolysis (AH) of the two liquid fractions obtained from the SE8 pre-treatment (SE8.1 and SE8.2). The total glucose and xylose yield was calculated from the sum of monomers present in the two liquid fractions.

Figure 1

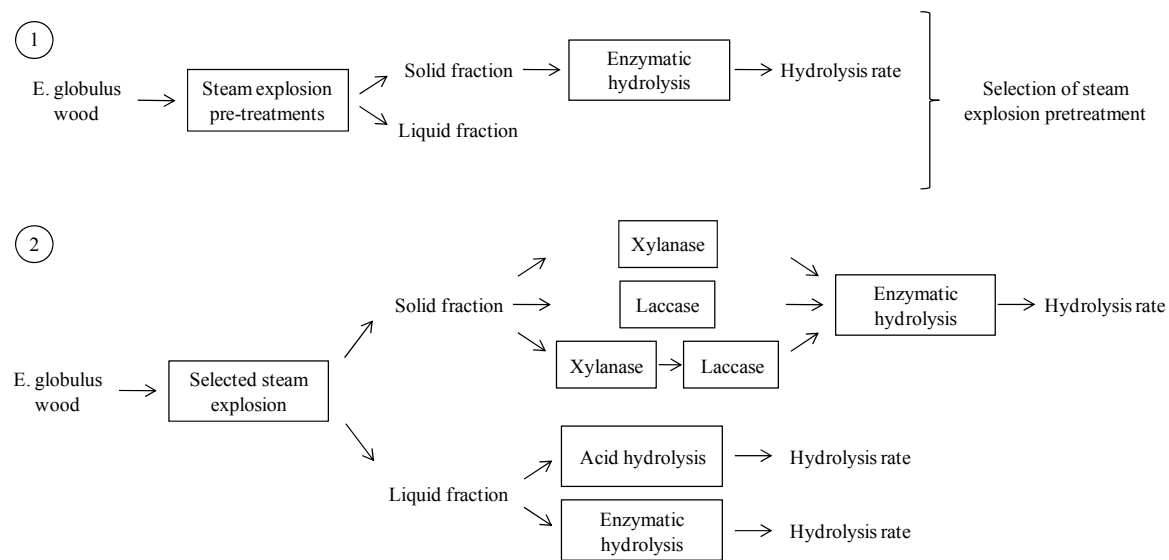


Figure 2

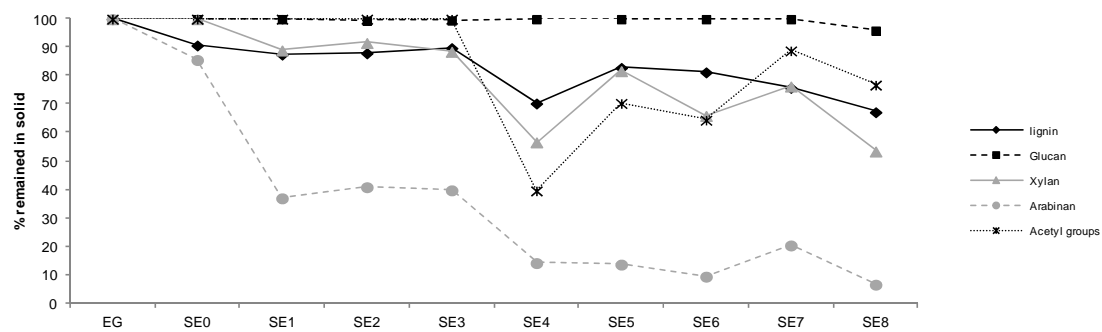


Figure 3

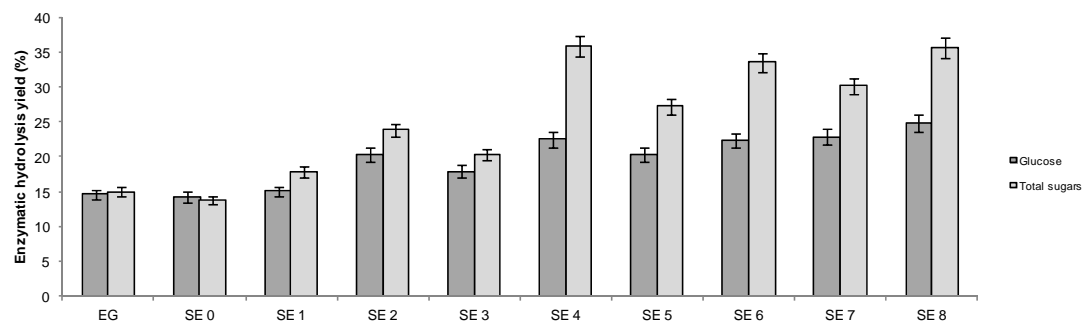


Figure 4

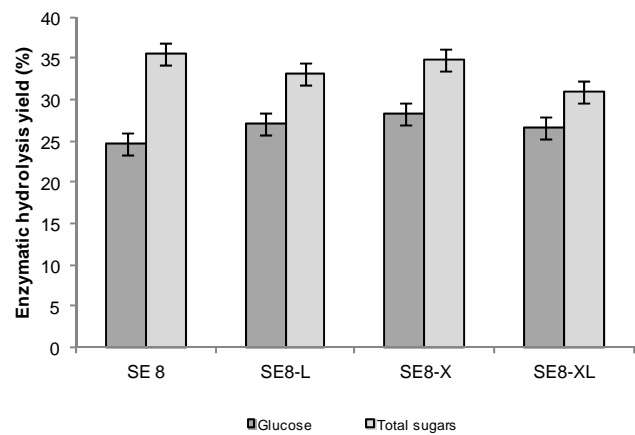


Figure 5

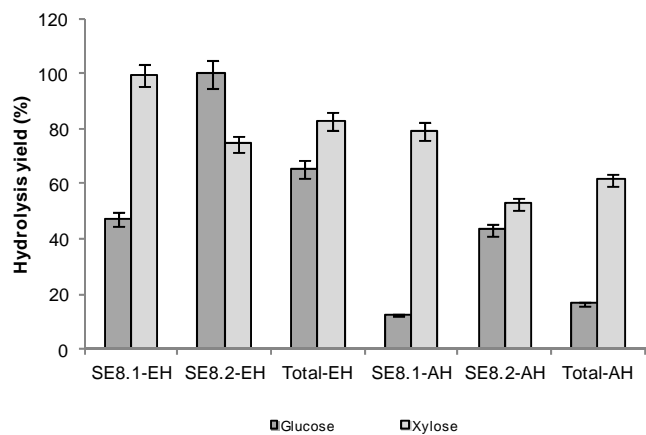


Table 1. Steam Explosion Conditions

Sample	Pre-extraction	Number of cycles	Duration first cycle (min)	Severity factor (S ₀)
Control A (Euc. G.)	No	-	-	-
Control B (SE0)	Yes	-	-	-
SE1	No	1	5	3.14
SE2	Yes	1	5	3.14
SE3	No	1	10	3.44
SE4	Yes	1	10	3.44
SE5	No	2	5	3.35
SE6	Yes	2	5	3.35
SE7	No	2	10	3.56
SE8	Yes	2	10	3.56

Table 2. Chemical composition of the original *Eucalyptus globulus* (EG) and solid fractions after steam explosion pre-treatments, expressed as g per 100 g of sample.

Sample	Yield	Ethanol extractives	Klason lignin	Ac. Sol. lignin	Glucan	Xylan	Arabinan	Acetil groups
E.G	100	0.7	20.6	4.8	46.0	15.6	0.24	4.1
SE0	99	0.8	20.1	3.1	47.7	15.8	0.21	4.4
SE1	94.6	3.9	19.4	4.1	49.3	14.6	0.09	4.6
SE2	94.8	3.8	19.5	4.1	48.3	15.0	0.10	4.7
SE3	93.8	2.8	20.0	4.2	48.9	14.7	0.10	4.5
SE4	84.5	8.7	17.9	3.1	54.6	10.4	0.04	1.9
SE5	90.4	3.4	19.1	4.1	51.6	14.0	0.04	3.2
SE6	88.1	3.1	19.6	3.7	55.2	11.6	0.0	3.0
SE7	87.6	6.4	18.9	3.0	54.0	13.5	0.1	4.2
SE8	79.7	8.3	18.6	2.7	55.5	10.4	0.0	4.0

Table 3. Chemical characterization of the solid fractions from steam explosion pre-treatments, after the enzymatic hydrolysis, expressed as g per 100 g of sample.

Sample	Ethanol extractives	Klason Lignin	Ac. Sol. lignin	Glucan	Xylan	Arabinan	Acetil groups
E.G	1.2	21.6	3.7	48.0	15.5	0.5	2.2
SE0	0.8	19.5	3.8	47.4	15.1	0.4	2.7
SE1	2.1	22.7	2.4	50.6	14.0	0.5	2.0
SE2	2.0	22.6	4.0	48.1	14.3	0.6	3.2
SE3	1.9	21.5	3.7	49.1	11.1	0.9	3.2
SE4	6.1	21.2	2.6	53.1	10.3	0.6	2.2
SE5	2.5	21.3	3.3	51.3	10.0	0.6	3.0
SE6	3.4	26.5	3.1	52.4	8.5	0.7	2.9
SE7	4.1	22.1	2.9	54.1	9.2	0.3	1.8
SE8	5.0	25.1	2.4	51.5	7.7	0.6	2.7

Table 4. Chemical characterization of the liquid (g/l) obtained after enzymatic hydrolysis of the solid fractions from steam explosion treatments. [A] and [AO] indicate the monomer and oligomer concentrations, respectively.

	Glucose		Xylose		Arabinose		Acetic Acid	
	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]
EG	3.54	0.06	0.52	0.35	0.65	0.22	0.17	0.07
SE0	3.57	0.29	0.29	0.22	0.63	0.12	0.1	0.02
SE1	3.90	1.35	1.31	0.84	0.47	0.45	0.32	0.11
SE2	5.17	0.2	1.61	0.51	0.7	0.23	0.49	0.17
SE3	4.61	0.62	1.17	0.44	0.8	0.23	0.23	0.1
SE4	6.47	0.46	3.75	0.92	1.06	0.12	0.99	0.16
SE5	5.53	0.18	2.42	0.53	0.81	0.25	0.64	0.11
SE6	6.49	0.42	3.28	0.15	0.93	0.15	1.1	0.23
SE7	6.49	0.16	2.83	0.52	0.79	0.2	0.61	0.17
SE8	7.21	0.01	3.55	0.4	0.92	0.04	0.65	0.14

Table 5. Chemical characterization before and after the enzymatic hydrolysis of the SE8 solid fraction treated with laccase (L) and/or xylanase (X), expressed as g per 100 g of sample.

Sample	Ethanol extractives	Klason Lignin	Acid Sol. lignin	Glucan	Xylan	Arabinan	Acetil groups
Before enzymatic hydrolysis							
SE8-L	5.6	21.1	2.7	58.8	9.1	0.6	2.1
SE8-X	5.8	19.7	2.8	58.6	8.7	0.6	2.9
SE8-XL	4.2	21.1	2.6	58.7	9.1	0.6	3.1
After enzymatic hydrolysis							
SE8-L	4.5	22.1	2.6	52.9	8.0	0.6	2.3
SE8-X	4.3	21.9	2.7	52.8	8.0	0.6	2.3
SE8-XL	3.5	23.3	2.8	52.9	8.0	0.6	2.8

Table 6. Chemical characterization of the liquid (g/l) obtained after enzymatic hydrolysis of the SE8 solid fraction treated with laccase (L) and/or xylanase (X). [A] and [AO] indicate the monomer and oligomer concentrations respectively.

	Glucose		Xylose		Arabinose		Acetic Acid	
	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]
SE8-L	8.27	0.72	2.27	0.00	0.85	0.02	0.54	0.14
SE8-X	8.73	0.58	2.32	0.16	0.83	0.07	0.58	0.14
SE8-XL	8.15	0.52	1.82	0.12	0.71	0.05	0.49	0.11

Table 7. Chemical characterization of the liquid fractions (g/l) obtained during the two SE8 cycles of steam explosion and percentage of sugar recovered in the liquid respect to the sugar content in the raw material (EG). [A] and [AO] indicate the monomer and oligomer concentrations respectively.

	Glucose		Xylose		Arabinose		AceticAcid		% Recovery	
	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	[A]	[AO]	Glucose	Xylose
SE8-1	0.32	1.45	0.07	1.14	0.04	0.28	0.06	0.01	4.1	8.2
SE8-2	0.19	0.08	0.03	2.48	0.05	0.07	0.12	0.02	0.6	17.1
Total									4.7	25.3

PUBLICACIÓN IV:

Integration of Kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Revilla, E., Martín, J.A., Villar, J.C.

BioResources. 2011. 6(1): 513-528.

INTEGRATION OF KRAFT PULPING ON A FOREST BIOREFINERY BY THE ADDITION OF A STEAM EXPLOSION PRETREATMENT

Raquel Martin-Sampedro, Maria E. Eugenio, Esteban Revilla, Juan A. Martín, and Juan C. Villar *

Steam explosion has been proposed for a wide range of lignocellulosic applications, including fractionation of biomass, pre-treatment of biomass for ethanol production, or as an alternative to conventional mechanical pulping. Nevertheless, a steam explosion process could also be used as pretreatment before chemical pulping, expecting a reduction in cooking time due to the open structure of the exploded chips. Thus, to evaluate the effect of steam explosion as a pretreatment in the kraft pulping of *Eucalyptus globulus*, steam exploded chips and control chips were subjected to kraft cookings. Steam exploded chips provided pulps with reductions of kappa number by up to 70% with no significant change in viscosity. Therefore, the cooking time could be shortened by 60%, increasing the productivity and obtaining pulps with similar delignification degree to those of the control pulp. Furthermore, not only the production rate could be increased, but also most of the hemicelluloses could be recovered before pulping and converted to a value-added product. Finally, although exploded pulp had inferior mechanical strength, the optical properties, which are more important in eucalyptus pulps, were found to be better.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; Forest biorefinery; Kraft pulping; Steam explosion; Pulp properties

Contact information: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA. Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040, Madrid (Spain); *Corresponding author: villar@inia.es

INTRODUCTION

The concept of a forest biorefinery is based on the use of lignocellulosic biomass as raw material in the integrated production of fuels, energy, and chemical products. The possibility of transforming a chemical pulp mill into a forest biorefinery is attracting widespread research interest. Such a transformed mill could produce higher value-added products such as ethanol, polymers, carbon fibers, and diesel fuel, in addition to pulp (San Martín et al. 1995; Van Heiningen 2006; Ragauskas et al. 2006). One of the ways to achieve this goal is to extract a portion of the hemicelluloses from wood prior to pulping, obtaining a liquid fraction that could be converted into ethanol and/or other chemical products. The hemicelluloses extraction could be done by different treatments, such as acid hydrolysis, autohydrolysis, steam explosion, or alkali extraction; however, steam explosion treatment shows some advantages that make it a competitive process to extract hemicelluloses.

The steam explosion process consists of treatment of lignocellulosic material with high-pressure steam, followed by a rapid decompression, which forces the fibrous material to “explode” into separated fibers and fiber bundles. When no other chemicals are added to the process, the high-temperature steam (due to the high rate of dissociation of water) leads to the release of acids from the acetylated wood components; the released acids then catalyze hydrolytic reactions in the wood polymers. These autohydrolysis reactions result in a loss of hemicellulose and a decrease in the content of β -O-4 structures in lignin (Robert et al. 1988; Jakobsons et al. 1995; Josefsson et al. 2001, 2002). These chemical changes depend greatly on the temperature used and the treatment time (Chua and Wayman 1979).

The earliest application of this process was developed by Mason in 1928. This author proposed using a steam treatment followed by an explosive decompression for the production of Masonite board stock (Mason 1928). Another application was suggested by Babcock (1932), who used steam explosion as a pretreatment method for the production of ethanol. Steam explosion has also been proposed as an alternative to improve conventional mechanical or chemo-mechanical pulping methods (DeLong 1987). During this process, lignin is softened to allow higher defibration without excessive damage and/or degradation to individual fibers. However, the process has not been industrially implemented (Heitner et al. 1993) because pulps so produced have not shown any superior properties over those from chemimechanical pulp (CMP) or chemithermo-mechanical pulp (CTMP).

As has been mentioned before, steam explosion could be also used to remove hemicelluloses, since during the steam treatment, hemicelluloses are depolymerized, partially degraded, and solubilized in hot water, yielding a mixture of monomeric and oligomeric sugars (Puls et al. 1985). Removed hemicelluloses can be a valuable source of hexose and pentose sugars, and they can be further converted into value-added products such as ethanol, polymers, and other chemicals (Li et al. 2010).

Removal of hemicelluloses from wood as a pretreatment step is being practiced commercially in the production of dissolving pulps, where the hemicelluloses are removed to allow the production of pure cellulose (Wafa Al-Dajani and Tschirner 2008). The most common commercial procedure for extracting hemicelluloses is pre-steaming to release natural wood acids (autohydrolysis) followed by water extraction or acid hydrolysis with small amounts of mineral acids (sulfuric acid or hydrochloric acid). Compared to these processes, steam explosion not only allows the recovery of wood components without their degradation (Avellar and Glasser 1998; Britt 1970), but also leaves a solid residue (exploded chips) that is expected to be pulped more easily than those obtained conventionally due to the open structure of the exploded chips that might encourage an efficient diffusion of cooking liquor into the fibers (Ahvazi et al. 2007). Therefore, taking into account the advantages of the steam explosion pretreatment, it can be concluded that this process could be used as an efficient pretreatment in pulping, increasing the total revenue stream for the pulp industry and converting the pulp mill into an integrated forest biorefinery (Ragauskas et al. 2006; Van Heiningen 2006).

Although some studies have assessed the pre-extraction of hemicelluloses before kraft pulping (Li et al. 2010; Wafa Al-Dajani et al. 2009; San Martin et al. 1995; Ahvazi et al. 2007), few of them have evaluated the potential of steam explosion to this end.

Therefore, deeper research would be needed to evaluate not only the effect of steam explosion pretreatment on kraft pulping, but also the potential recovery of sugars from the liquid fraction generated during this pretreatment.

The aim of this work was to evaluate the possibility of integrating a kraft pulping into a forest biorefinery, studying the sugar recovery and the effect of steam explosion on kraft pulping and pulp properties. We selected *Eucalyptus globulus* because it is the raw material most commonly used to produce kraft pulp in Spain, and also because it has a high content of hemicelluloses (pentosan content 17.9 % on o.d. wood).

EXPERIMENTAL

Steam Explosion Treatment

Eucalyptus globulus chips were kindly provided by La Montañanesa pulp mill (Torraspapel group, Spain). After two days conditioning in the laboratory (inside polyethylene bags) to guaranty the chips homogenization, chips were divided in two groups. One of them was immersed in water at 25°C (pre-extraction) during 16 hours to evaluate the effect of the uniformity of impregnation on the subsequent steam explosion treatment.

The steam explosion treatment was performed in a 26 liter stainless steel digester (manufactured by Cadepla S. L.) capable of achieving 190 °C temperature and 16 Kg/cm² pressure. The digester is connected to a blowing tank into which chips are discharged at the end of the treatment. In each experiment, 500 g of *E. globulus* chips were treated with steam at 183°C (10 Kg/cm²) during 5 or 10 minutes and discharged at 6 Kg/cm². The number of cycles was studied to prove that the improvement of the accessibility of the exploded chips (due to their open structure) is more influenced by the final explosion than by the steam treatment. When a second cycle was carried out, the exploded chips were treated with steam again during 3 minutes and discharged into the blowing tank. Table 1 summarizes the operational conditions applied.

The severity factor of each treatment was calculated according to the following equation defined by Overend and Chornet (1987).

$$S_0 = \log \left(e^{\frac{T-100}{14.75}} \cdot t \right) \quad (1)$$

in which T is the temperature (°C) and t the duration of the treatment (min).

The treated chips were then removed from the blowing tank, washed with cold water, air-dried, and finally weighted. The water content was measured to determine the total yield of the steam explosion process.

The water retention, or hydration capacity, of the chips was the weight of water absorbed by the chips after being immersed for 6 hours, and it was expressed as grams of water per 100 grams of dry wood.

The pretreatment that provided the highest water retention was selected for further studies. The pretreated chips were analyzed to determine: acetone extractives (UNE-EN ISO 14453), hot water extractives (UNE 57-013), lignin content (TAPPI T 222 om-88; UNE 57-100), and holocellulose content (Wise et al. 1946). Chips from control A were

also analyzed as reference. Also, the liquid fraction of the selected steam explosion was recovered to determine the sugar content. An aliquot (1 mL) was filtered through 0.45 µm membranes and used for direct HPLC determination of monosaccharides and acetic acid. A second aliquot of 25 mL was subjected to quantitative posthydrolysis with 4% H₂SO₄, at 120°C, for 60 min., before HPLC analysis. The increase in the concentrations of monosaccharides and acetic acid caused by posthydrolysis was used as a measure of the concentrations of oligomers and acetyl groups bound to oligosaccharides, respectively (Garrote et al. 1999).

Table 1. Steam Explosion Conditions

Sample	Pre-extraction	Number of cycles	Time of first cycle (min)	Severity factor (S ₀)
Control A	No	-	-	-
Control B	Yes	-	-	-
SE1	No	1	5	3.14
SE2	Yes	1	5	3.14
SE3	No	1	10	3.44
SE4	Yes	1	10	3.44
SE5	No	2	5	3.35
SE6	Yes	2	5	3.35
SE7	No	2	10	3.56
SE8	Yes	2	10	3.56

Kraft Cooking Process

Kraft cooking was performed on the chips pretreated by steam explosion and on those of control A in four 1-liter pressurized reactors. Reactors were placed in a 20 L rotatory pressurized vessel that contained hot water for indirect heating of the reactors. The rotatory vessel had a jacket-type electrical heater controlled by a computer to set the cooking temperature. Cooking conditions (referred to steam exploded chips, or non exploded chips in the control case) were: 60 g of dry chips, 4 L/Kg liquor to wood ratio, 16% active alkali, 20% sulfidity, 160 °C cooking temperature, and 60 minutes to maximum temperature. Time at maximum temperature was varied from 24 to 56 minutes to obtain an H-factor ranging from 180 to 400 (a control parameter in the pulping process which includes time and temperature as a single variable). The H-factor was calculated according to the following equation:

$$H = \int_0^t e^{\left(43.2 - \frac{16115}{T}\right)} dt \quad (2)$$

in which T is the temperature (K) and t the time (hours).

After each batch, the reactors were removed from the vessel, and the cooked chips were washed, disintegrated and screened to determine their reject content and screened and total kraft yields based on the solids content of the material submitted to kraft

pulping, whether steam-exploded or not. Moreover, the overall yield has been calculated taking into account both the steam explosion and the kraft processes. Black liquor was titrated with HCl to determine the chemical reagent consumption. The kappa number (TAPPI T-236/UNE 57034), viscosity (UNE 57039-1), and hexenuronic acid content (Gellersted and Li. 1996) were determined in the pulp samples. Also, the pulp quality was assessed in an optical microscope (Vanox AH3 Olympus connected to a Color View III digital camera).

The cooking process that produced the best pulp of those that were assayed was scaled up, changing the liquid-wood ratio and the active alkali because of an equipment limitation, as it will be explained below. Kraft cooking was done in a 26 L batch reactor furnished with a system for recirculation and heating of the cooking liquor. The cooking temperature was controlled by a computer running specially developed software. Due to the volume of the liquor recirculation circuit and to the characteristics of the steam exploded chips, the liquid-wood ratio had to be increased to 6 L/Kg in order to assure a complete immersion of the chips. The active alkali was also raised to 18% to approach the concentration in the small reactors, since a greater volume of water was used. Other cooking conditions were fixed as follows: 1000 g of dry chips, 20% sulfidity, 160 °C cooking temperature, 40 minutes to maximum temperature, and 27 minutes at cooking temperature (H-Factor of 200).

After the cooking process was completed, the chips were discharged into the blowing tank, washed, disintegrated, and screened to determine their reject content, screened and total yields, kappa number (ISO 302), and pulp viscosity (ISO 5351-1).

Control pulp, obtained from chips that were not subjected to the steam explosion pretreatment, had a high lignin content, needing further delignification to be comparable with the pulp from pretreated chips. Therefore, oxygen delignification was applied to this pulp in a 20 L rotatory reactor. Conditions of this treatment were: 0.6 MPa oxygen pressure, 10% consistency, 5% NaOH (on dry pulp), 0.5% MgSO₄ (on dry pulp), and 60 minutes of treatment at 110 °C. Control pulp characteristics were evaluated as previously described for the other pulps.

Refining and Handsheets Characterization

The degree of refining (Schopper–Riegler) (UNE-EN ISO 5267-1) was determined in exploded and control pulps (after oxygen delignification). Pulps were subsequently refined in a PFI mill (UNE-EN ISO 5264-2/TAPPI T- 248) to different refining degrees (1000, 2000, and 3000 revolutions) to obtain more conformable fibers for papermaking.

Handsheets were obtained from unrefined and refined pulps in accordance with ISO UNE-EN ISO 5269-2 and characterized in terms of apparent bulk density, tensile resistance, burst resistance, tear resistance (UNE-EN ISO 5270), brightness (UNE 57062), and yellowness index (TAPPI T-1216).

Accelerated Ageing

Exploded, control, and commercial pulps were subjected to accelerated ageing in order to study the evolution of their optical and mechanical properties and also the effect of the steam explosion pretreatment on this evolution. The accelerated ageing consisted

of a moist heat treatment at 80°C and 65% relative humidity during 6 days, according to the standard UNE 57092-4.

RESULTS AND DISCUSSION

Steam Explosion Treatment

Different steam explosion pre-treatments were performed at 183°C by changing three variables, as shown in Table 1. Depending on the conditions, the yield varied between 94.3 and 79.3%. The yield decreased with the intensity of the process, mainly depending on the treatment time (Fig. 1a). These results are consistent with those found by other authors (Wafa Al-Dajani et al. 2009; Li et al. 2010), who reported that the amount of hemicelluloses dissolved in the liquid fraction was higher when the autohydrolysis time increased.

The water retention capacity of the exploded chips could provide information about changes in the internal structure of the material and correlates with the intensity of the pretreatment. As shown in Fig. 1b, there was a significant increase in the water retention capacity of all materials after steam explosion. This fact suggests that the accessibility of the exploded chips was increased, which would also improve the diffusion of cooking liquor during a subsequent chemical pulping process. The effect was more pronounced for stronger treatments, for which the addition of a second steam explosion cycle was the most influential factor (maximum increase 90%, comparing SE4 and SE8), followed by the treatment time (36%, comparing SE2 and SE4). The cold water pre-extraction of the original material also increased the effect of steam explosion. This finding may have two causes: (i) the removal of extractives during this pre-extraction, which could make steam penetration easier and would improve chips' hydrophilicity; and (ii) the higher amount of water in the pre-extracted chips, which would produce a more intense explosion and chip opening.

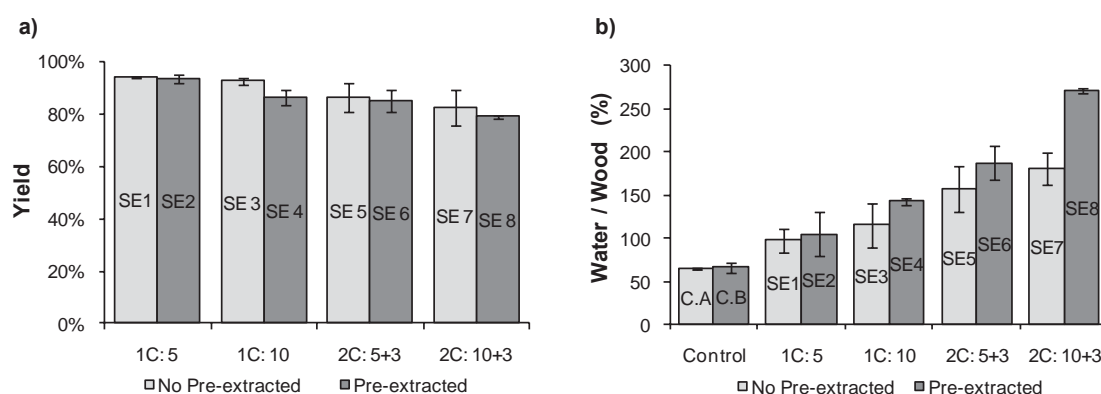


Fig. 1. Yield of steam explosion treatment (a) and water retention capacity of exploded chips (b)

Taking into account these results, the SE8 treatment, consisting of water pre-extraction followed by two steam explosion cycles of 10 and 3 minutes, was selected as the most appropriate pretreatment for kraft pulping. It provided chips with a more open

structure that could be pulped more easily. The low yield obtained under these conditions would reduce the overall yield after the kraft process, but it would remove unaltered hemicelluloses that could be converted into value-added products, polymers, or ethanol for fuel (Li et al. 2010), increasing the total revenue stream for the pulp mill (Ragauskas et al. 2006; Van Heiningen 2006).

The chemical composition of the SE8 and the Control A samples, as well as the sugar content of the liquid fraction from the SE8 treatment are shown in Tables 2 and 3, respectively. It can be observed that there was an increase in the extractives content (water soluble and acetone soluble) and a reduction in the holocellulose content of the wood chips after steam explosion. The increase in extractives could be due to the fact that, during the steam explosion treatment, some macromolecules, such as lignin and polysaccharides, are partially degraded, becoming extractible in a subsequent solvent extraction. The holocellulose reduction was due to the hemicellulose degradation during the steam explosion treatment, as has been mentioned above. The sugar content in the liquid fraction obtained during this treatment also confirmed this hemicellulose degradation, since xylose was the main sugar present in this fraction. Eight percent of the original solid material (*E. globulus*) was recovered as xylose, after the SE8 treatment, and this could be used to produce value-added products.

Table 2. Chemical Composition of Control (Control A) and Exploded Chips (SE8)

	Control A	SE8
Acetone extractives	1.1% ^a	4.9% ^a
Hot water extractives	2.8% ^a	7.5% ^a
Lignin	18.0% ^a	18.4% ^a
Holocellulose	73.9% ^a	64.7% ^a
Pentosans	17.9% ^a	10.4% ^a
Holocellulose / lignin ratio	4.1	3.5

^a Referred to weight/weight over dry wood

Table 3. Sugar Contents of the Liquid Fraction from the Steam Explosion Treatment SE8

	g/L ^a	% extracted ^b
Acetyl groups	1.7	4.6%
Glucose	0.2	0.5%
Xylose	3.0	8.0%
Arabinose	0.04	0.1%
Total	4.96	13.2%

^a Including monomers and polymers

^b Weight of extracted sugar respect to weight of original material

Kraft Pulping Process

Non-pretreated chips (control A) and exploded chips (SE8) were pulped under the same conditions to compare the resulting pulps. The cooking time varied from 24 to 56 minutes (corresponding to an H-Factor varying from 180 to 400), in order to evaluate the effect of steam explosion at different cooking conditions.

Total and screened kraft yields (without taking into account steam explosion yield; in other words, the yield calculation was based on the solids content of the material submitted to kraft pulping, whether steam-exploded or not) have been plotted versus the H-Factor in Fig. 2a and 2b, respectively. The total yield of both control and exploded samples decreased with the cooking time (higher H-Factor) because more lignin, and also more carbohydrates, were dissolved in the cooking liquor. Total and screened yields obtained with control chips were higher than those obtained with exploded chips in all cases, except from screened yields when the H-Factor was lower than 200. In order to explain this phenomenon, it has to be taken into account that when short pulpings were performed, control chips were not cooked long enough and a high amount of rejects was obtained; therefore a higher total yield and a lower screened yield were achieved. On the other hand, when longer pulping was carried out, control chips were cooked long enough, but exploded chips were overcooked, dissolving a high amount of carbohydrates in the cooking liquor and obtaining lower yields. However, the last comparison was made for the same H-factor, and the exploded and control chips did not need the same pulping intensity. Therefore, a comparison focusing on the kappa number of the pulps would be more appropriate.

In Fig. 2c and 2d it can be observed that the steam explosion pretreatment increased the consumption of both Na_2S and NaOH during kraft pulping, in contrast to what has been reported by San Martin et al. (1995). However, this higher chemical consumption produced pulp with a lower kappa number (as it will be explained below), suggesting a higher efficiency of the chemical in delignification.

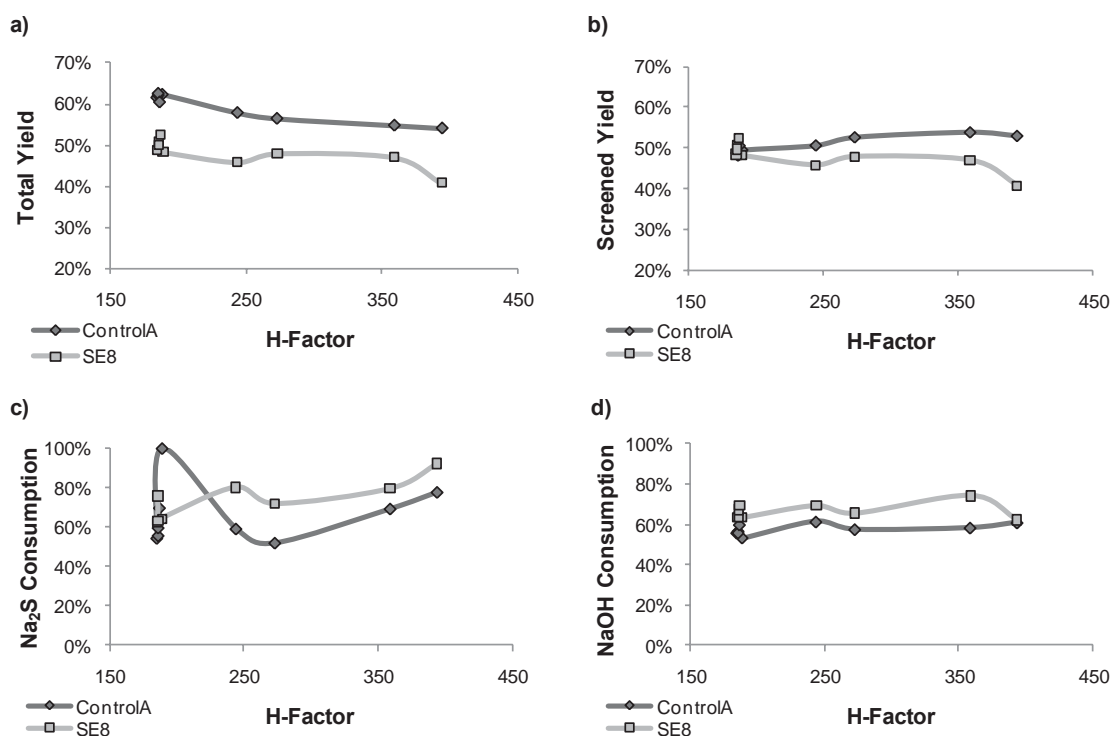


Fig. 2. Yields and chemical consumption during kraft pulping of control (Control A—◆—) and exploded chips (SE8—□—): total yield (a), screened yield (b), Na_2S consumption (c), and NaOH consumption (d)

In Fig. 3a and 3b, the kappa number and viscosity of exploded and control pulps are plotted versus the H-factor. Kappa numbers of exploded pulps were much lower than those obtained for control pulps due to the open structure of exploded chips, which increases the reagent accessibility. A maximum reduction of 70% in the kappa number (from 49 to 16) was observed when exploded chips were cooked under the mildest conditions (H-factor of 180). These results are similar to those found by San Martin et al. (1995), although they obtained a lower decrease in the kappa number (44% from control pulp). Moreover, the kappa number decreased, as it was expected, when cooking was more intensive (higher H-factor) because more lignin was removed. This drop in the H-factor was lower in the cases of exploded pulps because the kappa number obtained with an H-factor of 180 was already low, and removing the residual lignin was more difficult and caused the degradation of more carbohydrates (providing a lower screened yield with longer pulping processes).

With regard to pulp viscosity, similar values were found in most of the samples and were comparable with the values reported for commercial pulps. However, the viscosity of the exploded pulp decreased dramatically when the H-Factor was higher than 360 due to overcooking of the chips, causing cellulose degradation (not observed in control chips). For an H-Factor of 270, the same viscosity was found for exploded and control pulps although the kappa number was much lower for the former (11.2 versus 30.4). Therefore, higher delignification could be obtained with exploded pulp without degrading carbohydrates.

Moreover, the content of hexenuronic acids (HexA) was found to be lower in exploded pulp than in control pulp (Fig. 3c). Taking into account that hemicelluloses are dissolved during the steam explosion pretreatment and that HexA are formed from xylans during kraft pulping, exploded chips gave pulps with lower HexA content. This could be a great advantage of the steam explosion pretreatment because the presence of HexA is detrimental to bleaching, since it increases the consumption of bleaching chemicals (Vuorinen et al. 1999; Ragnar 2001). On the other hand, the loss of hemicellulose in the steam explosion pretreatment could be detrimental to the refining and mechanical properties of the handsheets. This effect will be considered later in this article.

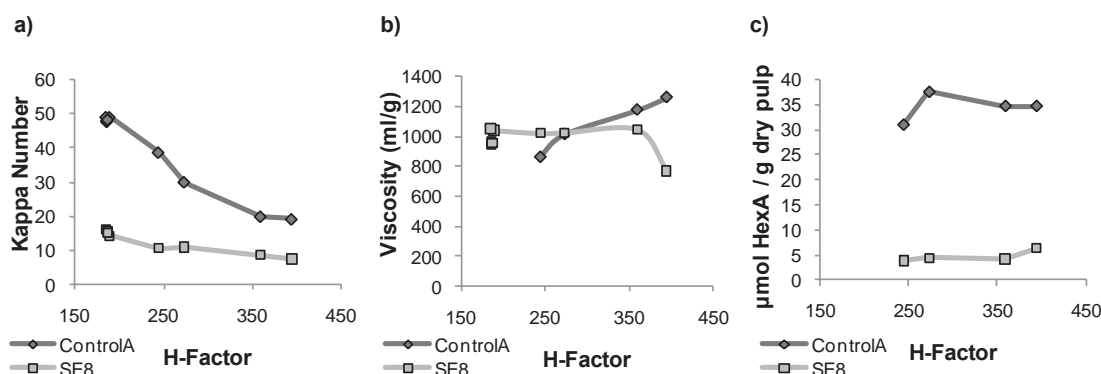


Fig. 3. Kappa number (a), viscosity (b) and hexenuronic acids content (c) of kraft pulps obtained from control (Control A—◆) and exploded chips (SE8—□)

In Fig. 4, fibers from exploded and control pulps can be observed. These pictures show that, after the 24 minute pulping process (H-factor of 190), control chips had not cooked long enough, presenting a high number of fiber bundles (shives). On the contrary, neither shives nor broken or degraded fibers were found in pulp produced from exploded chips.

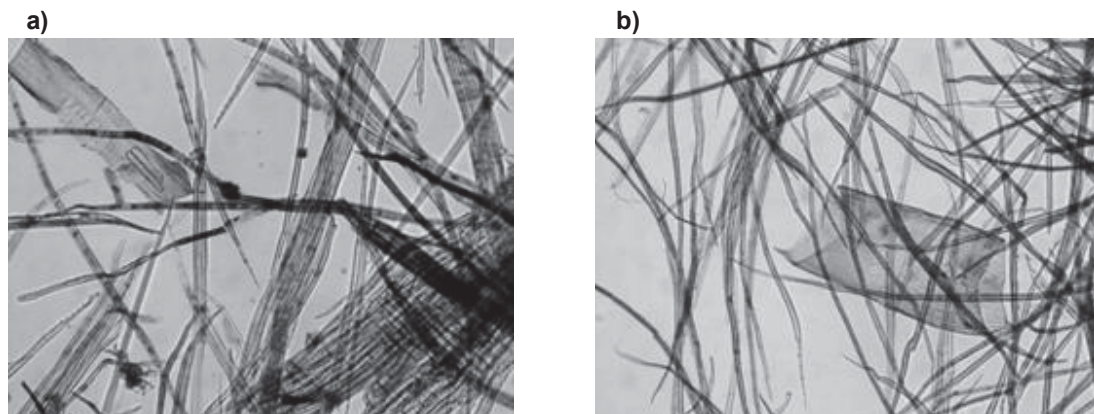


Fig. 4. Pulp fibers obtained from (a) control chips (Control A) and (b) steam exploded chips (SE8)

From all these results, an H-factor of 200 (27 minutes at maximum temperature) was selected, because a more intensive cooking would overcook the steam exploded chips, as has been indicated above. This process was scaled up in a 26-L digester in order to evaluate the effect of the scale change as a first step prior to the industrial scale-up. The kappa number, the viscosity, and the total and screened kraft yield obtained for steam exploded (SE8) and untreated chips (control A) are shown in Table 4.

Tabla 4. Yields and Pulp Characteristics Obtained during Scaled Up Kraft Cooking and Subsequent Oxygen Delignification

	SE8	Control A	Control A+O ₂	Industrial
Kappa Number	15.5	50.6	26.4	14.0
Viscosity (ml/g)	1166	-	915	1136
Screened Yield (%) ^a	49.6	28.6	25.7 ^b	-
Total Yield (%) ^a	51.6	64.9	-	-

^a Screened and total yield were determinate without considering steam explosion yield.

^b Taking into account screened kraft yield and oxygen delignification yield.

A bigger difference in kraft yields between a steam-exploded and a control sample was obtained when pulping was scaled up. However, the difference in kappa number was found to be similar to that observed when pulping was performed in small reactors.

As was mentioned above, pulp obtained from untreated chips (Control A) had much higher lignin content than that obtained from exploded chips. In order to obtain a more comparable pulp in terms of refining and paper properties, the control pulp was subjected to oxygen delignification. In Table 4 it can be observed that, after this treatment, the kappa number decreased significantly, but the viscosity also decreased. However, with a steam explosion pretreatment, both a low kappa number and high

viscosity could be simultaneously obtained. These results corroborate that steam explosion followed by a short kraft pulping pretreatment is a more efficient process than short kraft pulping followed by oxygen delignification.

From all these results, it can be concluded that, under the same cooking conditions, the steam exploded chips cooked faster and more efficiently than the untreated chips, or alternatively, they could be pulped at a lower temperature and/or with lower active alkali, while maintaining the same production rate (Ahvazi et al. 2007; San Martin 1995; Wafa Al-Dajani et al. 2009). With the first option, the cooking time could be reduced, increasing the production rate of the pulp mill. Moreover, as the hemicelluloses have been removed before pulping, the charge of solids in the recovery furnace has been reduced also and an increase of pulp production could be possible.

In these trials, the cooking time was reduced from 50 to 20 minutes to obtain a pulp of similar characteristics (kappa number ~16 and viscosity ~1000 ml/g) with a good yield (+50%). Even though the overall pulp yield of the process (including steam explosion and kraft pulping) was lower (~40%), the pulp production of a hypothetical mill could be maintained at a similar level because of the increase in pulp production. Moreover, most of the hemicelluloses were removed before pulping without excessive degradation and converted into value-added products. Finally, since the exploded pulp had a very low HexA content, the consumption of chemicals in a subsequent bleaching process is expected to be reduced also.

Refining and Handsheet Properties

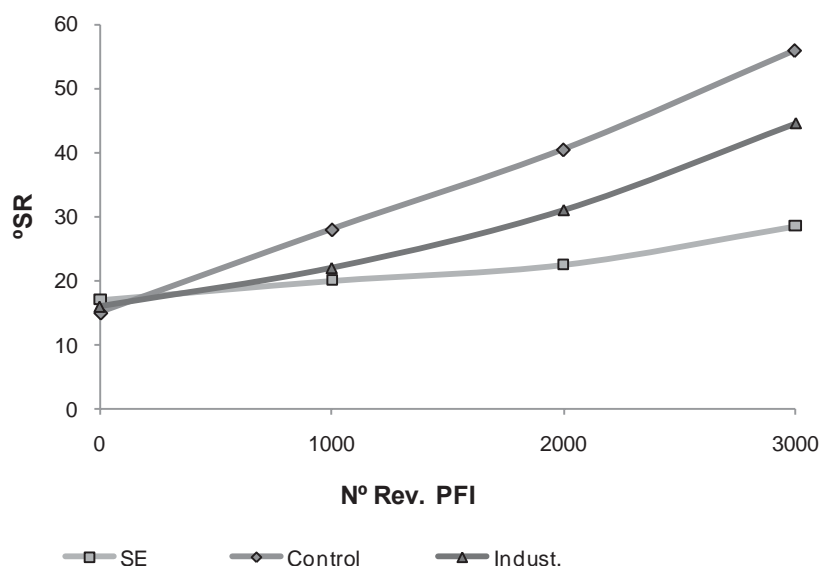


Fig. 5. Refining degree (°Schopper-Riegler) vs. refining intensity (PFI revolutions): SE —□—; Control —◇—; Indust. —▲—

The response of exploded pulp to refining was evaluated and compared with the control pulp response. As has been mentioned, before refining, the control pulp was subjected to oxygen delignification to obtain a pulp with lignin content similar to that of the steam explosion pulp. Moreover, an industrial pulp (kindly provided by Torraspapel group) was also refined and used as reference. The variation of the refining degree (measured as Schopper–Riegler) with the intensity of the PFI refining is plotted in Fig. 5.

It can be observed that the exploded pulp exhibited a slower increase of °SR with PFI revolutions than control and industrial pulps did. This means that the exploded pulp requires more energy to obtain a certain °SR. This could be due to the removal of hemicelluloses during the steam explosion pretreatment, as has been mentioned above. Moreover, the control pulp showed a higher °SR for a given PFI revolution number compared to the industrial pulp studied.

Handsheets were formed from unrefined and refined control, industrial, and exploded pulps, and their mechanical and optical properties were determined. Results are shown in Fig. 6.

The unrefined steam exploded pulp showed a °SR of 17, similar to that obtained for unrefined control and industrial pulps (15 and 16 °SR respectively). Also, the mechanical properties were found to be similar to those of unrefined industrial pulp, apart from the tensile index. This index is related to the linking capacity between fibers, so the low value obtained for the exploded pulp could be due to the loss of hemicelluloses during the steam explosion pretreatment. Tear index was found to be similar for unrefined exploded and industrial pulps, which would indicate a similar degree of fiber degradation, consistent with what San Martín et al. (1995) have reported.

It can be observed also in Fig. 6 that the apparent bulk density increased with refining in a similar way for exploded, control, and industrial pulps.

The mechanical properties also increased with refining in all pulp samples, as was expected. Tensile and burst indexes were found similar for control and industrial pulps but lower for the exploded pulp. As has been mentioned above, this could be due to the removal of hemicelluloses during steam explosion.

Although control and industrial pulp tear indexes were higher than the exploded pulp tear index, the differences between them were lower than those observed in tensile and burst indexes. Unrefined exploded and industrial pulps gave similar values of tear index; however when refining was performed, the industrial pulp showed a better evolution, providing higher values of tear index.

In order to compare optical properties, the brightness, yellowness index, and opacity of dried pulp sheets were measured. The steam exploded pulp presented the best optical properties, since its yellowness index was found to be much lower than that of the control and industrial pulps, its opacity was higher than that of the control pulp, and its brightness was higher than that of the industrial pulp. Considering the evolution of the optical properties with refining, it can be observed that yellowness index and opacity did not change, but brightness decreased when the °SR increased. This could be caused by the homogenization of the pulp resulting from the split of the microscopic fiber bundles present in the pulps.

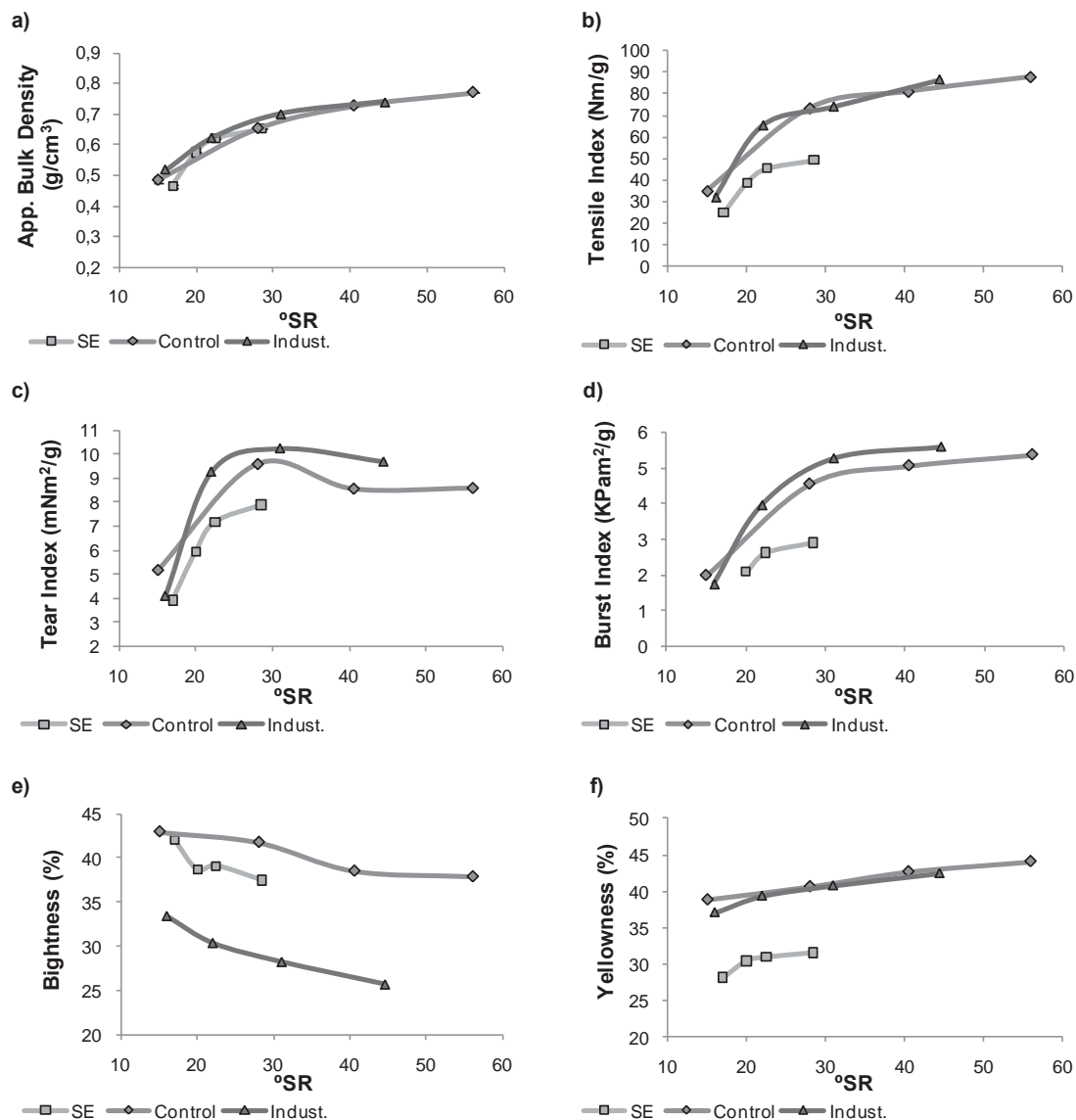


Fig. 6. Mechanical and optical properties of handsheets from exploded (SE—□—), control (Control—◆—) and industrial (Indust.—▲—) pulps: a) apparent bulk density, b) tensile index, c) tear index, d) burst index, e) brightness, and f) yellowness index.

Based on the last results, it can be concluded that although exploded pulp showed slightly lower mechanical properties, optical properties were better than those of control and industrial pulps. Therefore, depending on the final paper use, exploded kraft pulp could be a good alternative to conventional kraft pulp.

Accelerated Ageing

The exploded, control, and industrial pulps were subjected to accelerated ageing in order to study the evolution of their optical and mechanical properties. Moreover, the effect of the steam explosion pretreatment on this evolution was evaluated.

Table 5 shows the changes occurring in mechanical and optical properties with ageing. The reduction percentage for each mechanical or optical property was calculated as an average of the reductions (positive values in Table 5) or increases (negative values in Table 5) observed at different °SR in each pulp before and after the accelerated ageing.

Table 5. Reduction of Mechanical and Optical Properties in Exploded, Control and Industrial Pulps after Accelerated Ageing

	SE8	Control A+O ₂	Industrial
Tensile Index	-1.2%	4.2%	-3.8%
Tear Index	8.3%	10.7%	16.2%
Burst Index	-1.0%	8.4%	8.0%
Brightness	4.6%	9.2%	2.7%
Yellowness Index	-16.7%	-2.0%	-9.3%

After six days of accelerated ageing, the tensile index did not decrease significantly, while the tear and burst indexes were more affected. The steam exploded pulp showed the lowest decrease in brightness with ageing of all samples, but in the control pulp, the decrease was more pronounced than in the other pulps (9.2%). However, the steam exploded pulp presented the biggest increase in yellowness index (-16.7%), but even after ageing, the exploded pulp exhibited lower values of yellowness index than the control and industrial pulps.

From all these results, the steam explosion pulps exhibited a more favorable evolution with time, experiencing a lower decrease in their mechanical and optical properties after the accelerated ageing.

CONCLUSIONS

1. During steam explosion pretreatment most of the hemicelluloses could be recovered before pulping and converted in value-added products. In this way, a *Eucalyptus globulus* kraft pulp mill could be transformed into a forest biorefinery.
2. The steam explosion pretreatment reduced the cooking time from 50 to 20 minutes, obtaining a similar pulp and increasing the production rate of the mill.
3. Although the exploded pulp required more energy during refining, the mechanical properties were found to be just slightly lower and the optical properties higher than those from control and industrial pulps.
4. After an accelerated ageing both mechanical and optical properties were found to be more stable for exploded pulp than for control and industrial pulps.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via Project CTQ 2006-00385, CTQ 2009-11268, the Ramón y Cajal Programme, and the FPI fellowship (BES2007 – 14528).

REFERENCES CITED

- Ahvazi, B., Radiotis, T., Bouchard, J., and Goel, K. (2007). "Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips," *J. Wood Chem. Technol.* 27(2), 49-63.
- Avellar, B. K., and Glasser, W. G. (1998). "Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation," *Biomass Bioenerg.* 14 (3), 205-218.
- Babcock, L.W. (1932). "Method of producing fermentable sugars and alcohol from wood," U.S. Patent No. 1855464.
- Britt, K. W. (1970). *Handbook of Pulp and Paper Technology*, 2nd edn. Van Nostrand, New York.
- Chua, M. G. S., and Wayman, M. (1979). "Characterization of autohydrolysis aspen (*P.tremuloides*) lignin. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin," *Can. J. Chem.* 57, 1141-1149.
- Delong, E. A. (1987). "Method of rendering lignin separable from cellulose and hemicelluloses and the product so produced," *Canadian Pat.* 1217765.
- Garrote, G., Dominguez, H., and Parajo, J. C. (1999). "Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood," *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 74, 1101-1109.
- Gellersted, G., and Li, J. (1996). "An HPLC method for the quantitative determination of hexeneuronic acid groups in chemical pulps," *Carbohydr. Res.* 294, 41-51.
- Heitner, C., Argyropoulos, D. S., Miles, K.D., Karnis, A., and Kerr, R. D. (1993). "Alkaline sulphite ultra-yield pulping of Aspen chips – A comparison of steam-explosion and conventional chemimechanical pulping," *J. Pulp & Paper Sci.* 19(2), 58-70.
- Jakobsons, J., Hortling, B., Erins, P., and Sundquist, J. (1995). "Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood," *Holzforschung* 49, 51-59.
- Josefsson, T., Lennholm, H., and Gellerstedt, G. (2001). "Changes in cellulose supramolecular structure and molecular weight distribution during steam explosion of aspen wood," *Cellulose* 8, 289-296.
- Josefsson, T., Lennholm, H., and Gellerstedt, G. (2002). "Steam explosion of aspen wood. Characterization of reaction products," *Holzforschung* 53(3), 289-297.
- Li, H., Saeed, A., Jahan, M.S., Ni, Y., and Van Heiningen, A. (2010). "Hemicellulose removal from hardwood chips in the pre-hydrolysis step of the kraft-based dissolving pulp production process," *J. Wood Chem. Technol.* 30, 48-60.
- Manson, W. H. (1928). "Process and apparatus for disintegration of wood and the like," U.S. Patent No. 1655618.
- Puls, J., Poutanen, K., Körner, H.U., and Viikari, L. (1985). "Biotechnical utilization of wood carbohydrates after steaming pretreatment," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 416-423.
- Overend, R. P., and Chornet, E. (1987). "Fractionation of lignocellulosics by steamaqueous pretreatments," *Philos. Trans. R. Soc. London.* A321, 523-536.
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., Kim, D. H., Eckert, C.A., Hallett, J. P., and Liotta, C. L. (2006). "From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production," *Indus. Biotech.* 2(1), 55-65.

- Ragnar, M. (2001). "On the importance of the structural composition of pulp for the selectivity of ozone and chlorine dioxide bleaching," *Nordic Pulp Pap. Res. J.* 16, 72.
- Robert, D., Bardet, M., Lapierre, D., and Gellerstedt, G. (1988). "Structural changes in aspen lignin during steam explosion treatment," *Cell. Chem. Technol.* 22, 221-230.
- San Martin, R., Perez, D., and Briones, R. (1995). "Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion," *Bioresource Technol.* 53, 217-223.
- Van Heiningen, A. (2006). "Converting a kraft pulp mill into an integrated biorefinery," *Pulp Pap. Can.* 107(6), 141-146.
- Vuorinen, T., Fagerström, P., Buchert, J., Tenkanen M., and Teleman, A. (1999). "Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps," *Pulp Pap. Sci.* 25(5), 155-162.
- Wafa Al-Dajani, W., and Tschirner, U.W. (2008). "Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part I: alkali extraction," *Tappi J.* 7(6), 3-8.
- Wafa Al-Dajani, W., Tschirner, U.W., and Jense, T. (2009). "Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part II: Acid- and autohydrolysis," *Tappi J.* 30-37.
- Wise, L. E., Murphy, M., and Daddieco, A. A. (1946). "Chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and on studies on the hemicelluloses," *Tech. Assoc. Pap.* 29, 210-218.

Article submitted: November 11, 2010; Peer review completed: December 18, 2010;
Revised version received and accepted: December 23, 2010; Published: December 28, 2010.

PUBLICACIÓN V:

Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C.

Bioresource Technology. 2011. 102: 4530-4535.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips

R. Martín-Sampedro, M.E. Eugenio, J.C. Villar^{*}

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA, Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2010

Received in revised form 22 December 2010

Accepted 22 December 2010

Available online 30 December 2010

Keywords:

Steam explosion

Biobleaching

Laccase

Acetosyringone

Eucalyptus globulus

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the response to biobleaching of steam exploded kraft pulps and to compare the results with the controls. For this end, a laccase-mediator treatment using commercial laccase (Novozyme 51003) and a natural mediator (acetosyringone) were assayed, followed by alkaline extraction and hydrogen peroxide stages.

Our approach resulted in exploded biobleached pulps with lower kappa number and improved optical properties compared to controls, even after subjecting pulps to accelerated ageing. Additionally, use of hydrogen peroxide was reduced. The LMS (laccase-mediator system) had a smaller impact on the properties of the bleached pulps and on hydrogen peroxide consumption than the steam explosion process did.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The steam explosion process consists in the treatment of lignocellulosic materials with high-pressure steam followed by a rapid decompression which forces the fibrous material to “explode” into separated fibers and fiber bundles. If no chemicals are added to the process, the high-temperature of the steam releases acids from the acetylated wood components which catalyze auto-hydrolytic reactions in the wood polymers with the resulting loss of hemicellulose and decreased content of β -O-4 structures in lignin (Robert et al., 1988; Jakobsons et al., 1995; Josefsson et al., 2002, 2001).

Steam explosion has been proposed for a wide range of lignocellulosic applications, such as biomass fractionation, pre-treatment in bioethanol production or alternatives to conventional chemi-mechanical pulping (CMP) and chemi-thermo-mechanical pulping (CTMP). Also, recent reports have shown that the cooking liquor diffuses more freely into the open structure of exploded chips which leads to easier and shorter kraft pulping (Ahvazi et al., 2007; Martín-Sampedro et al., 2010). Moreover, hemicelluloses removed during the steam explosion pre-treatment can be further converted into value-added products such as ethanol, polymers and other chemicals (Li et al., 2010). As a result of all this, the total revenue streams for the pulp and paper industry could be increased, converting the pulp mill into an integrated forest biorefinery (Ragauskas et al., 2006; Van Heiningen, 2006). In addition,

exploded pulps have showed better optical properties and a lower hexenuronic acid content than control pulps (non-exploded) (Martín-Sampedro et al., 2010). Bearing in mind all these findings, improving the efficiency of the bleaching process by using exploded pulps seems a reasonable expectation and the evaluation of the steam exploded pulps response to bleaching could provide interesting results.

Elemental chlorine free (ECF) and totally chlorine free (TCF) sequences are the main bleaching processes used at the pulp and paper industry. However, TCF sequences normally use reagents such as oxygen, ozone or hydrogen peroxide which, because of their low selectivity for lignin, degrade cellulose and yield bleached pulps of lower quality which account only for a limited part of the market.

The application of biotechnology to this process has attracted considerable interest. Many researchers have pretreated pulps with enzymes, mainly with the laccase-mediator system (LMS), before applying the standard bleaching sequences (Viikari et al., 1986; Moldes et al., 2008; Eugenio et al., 2010a). These biobleaching studies have shown that enzymatically pretreated pulps require a smaller amount of chemicals in subsequent bleaching processes, that the quality of the pulp is maintained, if not improved, and that the pollutant load of the process effluents is reduced. However, these biobleaching processes have never been applied to exploded pulps. The improvement of pulp properties with steam explosion, combined with the advantages resulting from the use of enzymes, could increase the effectiveness of conventional industrial bleaching processes.

All these considerations have led our team to evaluate the response to biobleaching of steam exploded kraft pulps and to

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 913476761; fax: +34 913476767.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

compare the results with those obtained using non-exploded kraft pulps.

2. Methods

2.1. Raw materials and chemicals

Eucalyptus globulus chips and *E. globulus* kraft pulp were kindly provided by La Montañanesa pulpmill (Torraspapel group, Spain). This industrial pulp was obtained using standard kraft pulping without steam explosion pre-treatment, nor oxygen delignification. Its initial kappa number, brightness and viscosity were 14, 34.4 °ISO and 1136 ml/g, respectively.

2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) was purchased from Roche (Madrid, Spain). All other chemicals: acetosyringone (ASG), sodium hydroxide (NaOH), magnesium sulfate (MgSO₄), diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA), sodium sulfide (Na₂S) and hydrogen peroxide (H₂O₂) were reagent-grade and supplied by Merck (Barcelona, Spain) or Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

2.2. Pulps production

The steam explosion treatment of the *E. globulus* chips consists of cold water pre-extraction followed by two steam explosion cycles of 10 and 3 min each. In each cycle, chips were treated with steam at 183 °C (10 kg/cm²) and discharged at 6 kg/cm² into a blowing tank. The process yield was 80%, and 50% of the hemicelluloses were extracted. The composition of the exploded chips was: lignin content, 18.4%; holocellulose, 64.7%; acetone extractives, 4.9%; and hot water extractives, 12.4%.

Steam exploded chips and control chips (no steam explosion) were subjected to kraft cooking in a 26-L digester connected to a blowing tank by a pneumatic valve. The cooking liquor was heated indirectly with steam in an external tubular heat exchanger, and the cooking temperature was controlled by computer software. Operational conditions were: 18% active alkali, 20% sulfidity, 40 min to maximum temperature, 27 min at maximum temperature (160 °C) and a 6 L/kg liquor-to-wood ratio.

The pulp obtained from control chips was treated with oxygen for further delignification in a 20-liter rotatory reactor with a jacket-type electrical heater. Conditions of oxygen delignification were 110 °C, 60 min, 0.6 MPa of oxygen pressure, 5% NaOH o.d.p. (over dry pulp), 0.5% MgSO₄ o.d.p. and 10% consistency.

2.3. Enzymatic bleaching stage (L)

The enzyme used in the enzymatic stage was a commercial laccase from *Aspergillus* sp. (Novozyme 51003) supplied by Novozymes (Denmark). According to the product sheet, optimal laccase activity requires 70 °C temperature and a pH of 6 (100 mM phosphate buffer); however, placed in these conditions, this enzyme becomes unstable after 30 min. With longer treatments, the enzyme remained stable at 40 °C and a pH of 6. Also, under these last conditions, bleached pulps achieved better properties after 2 h of enzymatic treatment (data not shown). In view of all this, we selected 40 °C, pH 6 and 2 h as ideal conditions for the enzymatic bleaching.

All assays were performed in 500 ml pressurized reactors, using 50 g of exploded kraft pulp (SE) and 50 g of control pulp (non-exploded, NoSE). Also, we chose an industrial kraft pulp (Ind) to be subjected to this process and used as reference pulp. Pulps were intensely mixed with the laccase and chemicals before adding oxygen at a pressure of 6 kg/cm² and placing them, for 2 h, in a 40 °C thermostatic bath at a pH of 6. Consistency and laccase dose

were set at 10% and 17.5 U/g (o.d.p.), respectively. Here 1 U of laccase is defined as the amount of laccase required to convert 1 μmol/min of ABTS to its cationic radical (0.1 M phosphate buffer, pH 6, 24 °C). Acetosyringone was the natural mediator used in all enzymatic treatments at a concentration of 1.5% o.d.p. A few drops of 0.05% Tween 80 were added. We designated this enzymatic treatment as LMO₂.

Controls (No-LMO₂) were included in our experimental design. Although the laccase and the mediator were omitted here, the pulp was treated with an aqueous solution (buffer) with the same pH, time and temperature values as those used in other laccase pre-treatments, but without adding oxygen.

The importance of oxygen presence during the enzymatic bleaching stage is well established; nevertheless, in order to study its degree of influence, we carried out another enzymatic experiment (called LM-NoO₂) using the same conditions as those of the LMO₂ treatment and without the addition of oxygen.

2.4. Alkaline extraction (E) and hydrogen peroxide (P) treatments

Conditions for the alkaline extraction subsequent to the enzymatic treatment were: 1.5% NaOH, 5% consistency and 90 °C temperature for 120 min. Thereafter, pulps were washed, and a hydrogen peroxide bleaching stage was applied under the following conditions: 2% H₂O₂, 1.5% NaOH, 1% DTPA, 0.2% Mg₂SO₄, 5% consistency and 90 °C for 90 min. Residual hydrogen peroxide was analyzed in the bleaching effluent by standard titration.

2.5. Accelerated ageing

Next after the bleaching sequence (LEP), pulps were subjected to accelerated ageing in order to study the influence of steam explosion and enzymatic pre-treatment on optical properties. Accelerated ageing consisted of a moist heat treatment conducted at 80 °C and 65% relative humidity for 6 days, in accordance to the standard ISO 5630-3.

2.6. Pulps characterization

Unbleached pulps and pulps obtained after each step of the bleaching sequence (LEP) were characterized in terms of their kappa number, viscosity, brightness, yellowness index and CIE *L*a*b** and CIE *L*C** coordinates, in conformity with the standards ISO 302, ISO 5351-2, ISO 2470, T 1216 and T 527, respectively.

3. Results and discussion

After kraft pulping, exploded pulps had lower kappa number (15.5 vs 50.6), higher brightness (42 vs 29 °ISO) and higher viscosity (1166 vs 980 mg/l) than non-exploded pulps. Due to their high lignin content, non-exploded pulps needed further delignification before entering the bleaching sequence, so an oxygen delignification step was set up for them. Afterwards, both the exploded and the oxygen-delignified non-exploded pulps were subjected to a biobleaching process. An industrial kraft pulp was also put through the same biobleaching sequence in order to be used as reference.

3.1. Pulps properties

Figs. 1–4 represent the application of a biobleaching sequence to the exploded, non-exploded and industrial *E. globulus* kraft pulps, showing changes in kappa number, pulp viscosity, brightness and yellowness index, respectively, after the laccase-mediator

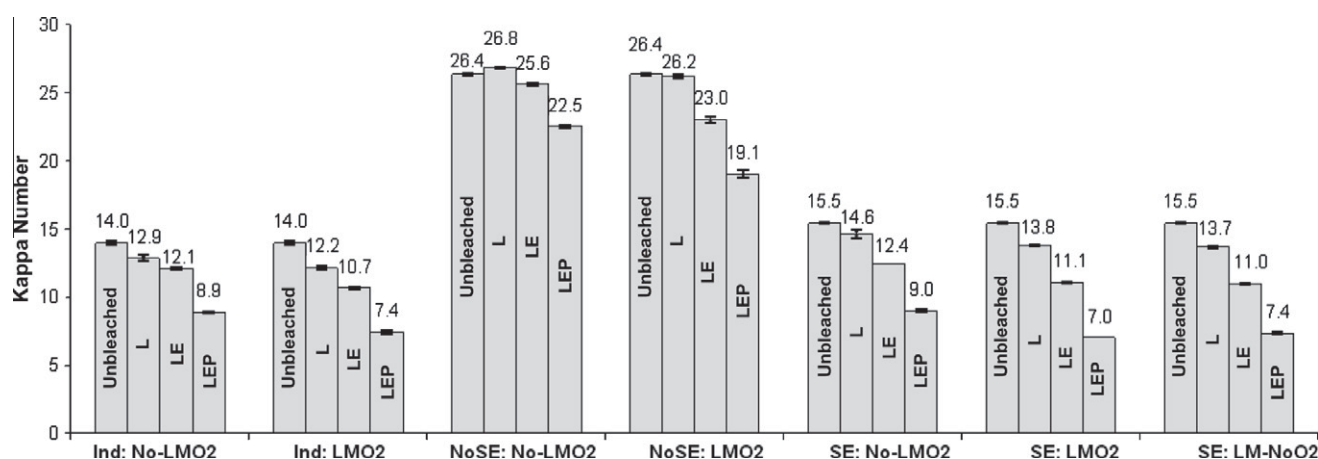


Fig. 1. Pulp kappa numbers for each stage in LEP sequences. L: laccase stage; E: alkaline extraction stage; P: hydrogen peroxide stage; Ind: industrial pulp; NoSE: control pulp without steam explosion pre-treatment; SE: steam exploded kraft pulp; No-LMO₂: no laccase, no mediator, no oxygen; LMO₂: laccase, mediator and oxygen; LM-NoO₂: laccase, mediator and no oxygen.

stage (L), the alkaline extraction (E) and the bleaching by hydrogen peroxide (P).

Fig. 1 shows that the kappa number of the unbleached exploded kraft pulp was lower than that found for the unbleached non-exploded kraft pulp. This means that a steam explosion pre-treatment, followed by short kraft pulping, caused higher delignification than short kraft pulping followed by oxygen delignification. On the other hand, the unbleached industrial pulp had a slightly lower kappa number than the exploded kraft pulp, suggesting similar delignification in both pulping processes. However, the steam explosion pre-treatment had the advantage of reducing the cooking time, which can potentially increase the pulpmill productivity (Martín-Sampedro et al., 2010).

In most cases, each stage in the biobleaching sequence led to a reduction in the kappa number. Moreover, using the LMS resulted in more pronounced reductions of the kappa number after each stage, compared to control treatments, an outcome also reported by other authors (Fillat et al., 2010; Valls et al., 2010). Thus, in non-exploded pulps, the total reductions of the kappa number at the end of the LEP sequence were 27.7% and 14.5% for biotreated pulp (NoSE:LMO₂) and its control (NoSE:No-LMO₂), respectively. Other authors have reported a greater reduction of the kappa number. However, these authors included more stages in the TCF bleaching sequence, used longer enzymatic and hydrogen peroxide treatments and added chemicals in higher concentrations (Moldes et al., 2010).

Kappa number reductions in exploded kraft pulps were greater than in non-exploded pulps (54.5% vs 41.7% for the SE LMO₂ and SE:No-LMO₂ treatments, respectively). These last results proved that the steam explosion pre-treatment significantly increased the reduction of the kappa number not only in laccase treated samples but also in control pulps. When exploded pulps were compared with an industrial pulp, a lower delignification was observed in the industrial pulp after the LEP bleaching (47.0% in biobleached industrial pulp [Ind:LMO₂] and 36.6% in the control pulp [Ind:No-LMO₂]). These results also suggested that a steam explosion treatment previous to kraft pulping could improve any subsequent bleaching process. This statement is in agreement with Josefsson et al. (2002), who reported that the stronger the steam explosion pre-treatment, the lower is the lignin content in pulps after a chemical bleaching.

To evaluate the effect of oxygen pressure in the LMS treatment, a control without addition of oxygen was performed on the pulp which showed the most efficient LEP bleaching (highest delignification degree). This experiment (SE:LM-NoO₂) produced, at the

end of the LEP sequence, a pulp with a slightly lower reduction of the kappa number (52.3%) than that observed with 6 kg/cm² of oxygen pressure (SE:LMO₂) (54.5%). These findings suggested that oxygen presence is not required during the enzymatic stage to improve delignification, and similar results have been reported elsewhere (Eugenio et al., 2010b).

The viscosity is an indirect indicator of the length of the polysaccharide chains in cellulose pulps. As Fig. 2 shows, non-exploded pulps had slightly less viscosity than exploded pulps. This can be explained by the elimination of short chain polysaccharides, such as hemicelluloses, in the steam explosion treatment, resulting in an increase in the average length of the polysaccharides. Hydrogen peroxide bleaching was found the most influential stage for viscosity reduction in the non-exploded pulps, whereas viscosity was mainly affected by the laccase treatment in the exploded pulps. The industrial and the exploded pulps had similar viscosity. However, hydrogen peroxide bleaching was found to be the viscosity determining stage for industrial pulps, as it was the case with the non-exploded pulps.

Despite viscosity reductions being small, there were not big differences in viscosity across all the bleaching processes. The same result has been observed by Oudia et al. (2008), who have demonstrated that high biodelignification can be achieved without decreasing pulp viscosity.

Fig. 3 shows that the brightness of the unbleached exploded kraft pulp was very similar to the brightness of the unbleached non-exploded kraft pulp, in spite of the higher lignin content found in the non-exploded unbleached pulp. In contrast to this, the unbleached industrial pulp showed lower brightness than the aforementioned pulps, probably because of the effect of a longer pulping process.

Also in Fig. 3, it can be observed that the highest increase in brightness took place during the hydrogen peroxide stage, as it was expected, whereas the laccase stage resulted in a reduction of brightness, probably as a result of the formation of chromophores during the oxidation of lignin by the laccase-mediator system (Fillat et al., 2010). This reduction was found more pronounced when the LMS was present, being these results consistent with others reported elsewhere (Moldes et al., 2008; Eugenio et al., 2010a). However, at the end of the LEP sequence, the effect was reversed, and higher brightness was obtained when using LMS as a pre-treatment. Therefore, it can be concluded that the LMS treatment improved the effectiveness in the subsequent bleaching stages, as other authors have also showed (Vivekanand et al., 2008; Moldes et al., 2010).

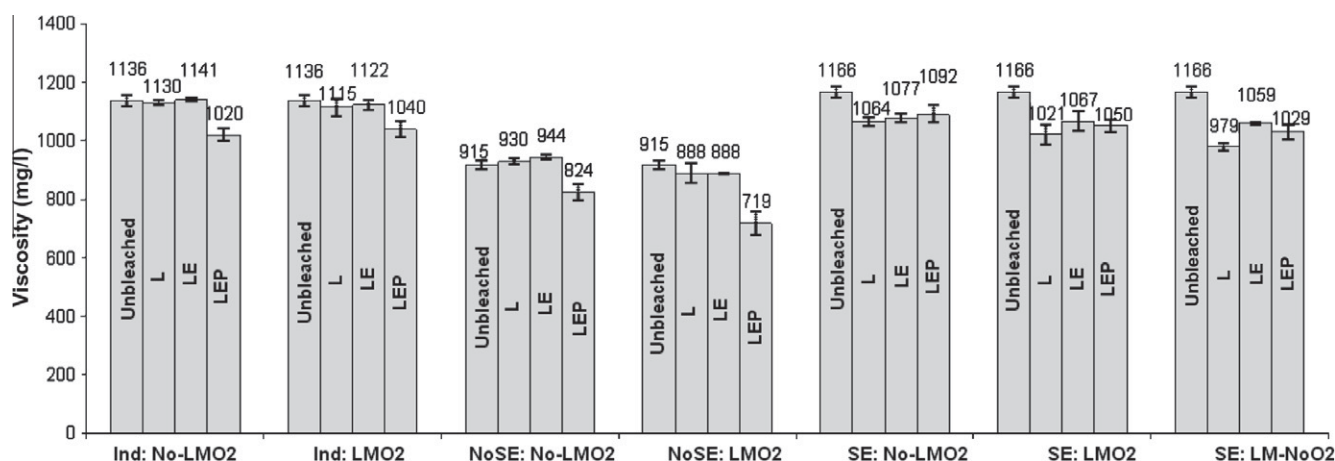


Fig. 2. Pulp viscosity for each stage in LEP sequences. L: laccase stage; E: alkaline extraction stage; P: hydrogen peroxide stage; Ind: industrial pulp; NoSE: control pulp without steam explosion pre-treatment; SE: steam exploded kraft pulp; No-LMO₂: no laccase, no mediator, no oxygen; LMO₂: laccase, mediator and oxygen; LM-NoO₂: laccase, mediator and no oxygen.

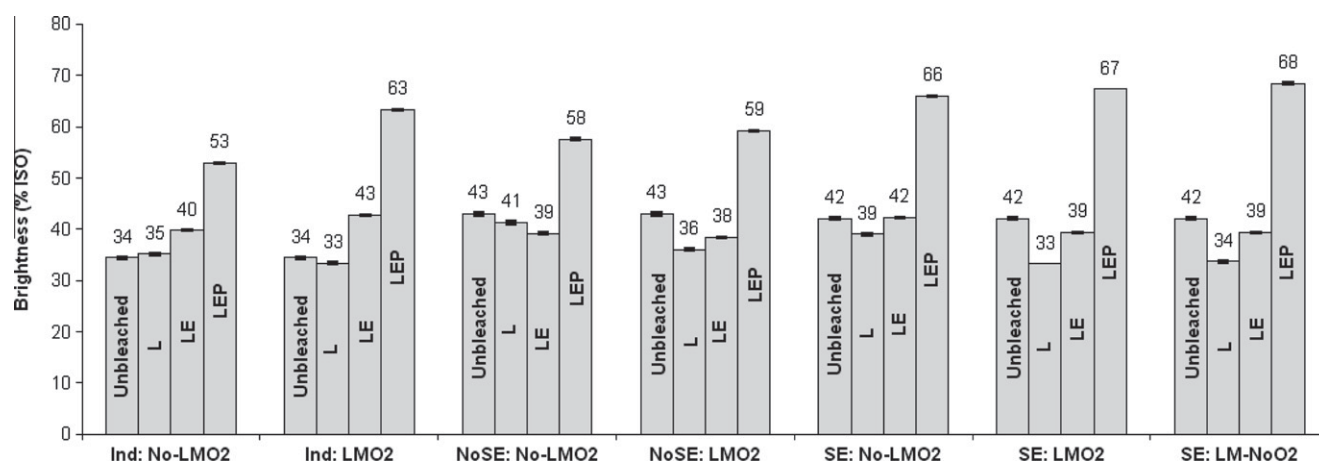


Fig. 3. Pulp brightness for each stage in LEP sequences. L: laccase stage; E: alkaline extraction stage; P: hydrogen peroxide stage; Ind: industrial pulp; NoSE: control pulp without steam explosion pre-treatment; SE: steam exploded kraft pulp; No-LMO₂: no laccase, no mediator, no oxygen; LMO₂: laccase, mediator and oxygen; LM-NoO₂: laccase, mediator and no oxygen.

If the brightness of exploded pulps at the end of the LEP sequence is compared to that of non-exploded pulps at the same point in the process, it is obvious that the steam explosion pre-treatment favored an increase in brightness during bleaching; specifically 25.2% over 16.3% ISO, for SE:LMO₂ and NoSE:LMO₂ respectively. The industrial pulp (Ind:LMO₂) reached a final brightness higher than the non-exploded pulp but lower than the exploded pulp, which leads to conclude again (as when the kappa number was discussed above) that introducing the steam explosion before pulping improves the subsequent bleaching process.

Fig. 3 shows that, at the end of the LEP sequence, the control pulp, SE:LM-NoO₂, had higher brightness than SE:LMO₂ (26.4% vs 25.2% ISO). Taking into account that this difference was not highly significant, and that the addition of oxygen did not improve the delignification considerably (as mentioned earlier in regards with the kappa number), it can be concluded that the addition of oxygen during the enzymatic bleaching was not a requisite to improve the bleaching process.

Fig. 4 shows the yellowness index of pulps before and after each bleaching stage. It can be observed that the unbleached steam exploded kraft pulp has a lower yellowness index than the non-exploded and the industrial kraft pulps. During the LEP sequence, an increase in the yellowness index occurred after the enzymatic

stage (L), being this increase more pronounced in the presence of LMS, and even more in the exploded kraft pulp. After the E stage, the yellowness index decreased in most cases to values near to those of the unbleached pulp. However, it was in the P stage that the biggest reductions took place. On the other hand, if the whole LEP sequence is taken into consideration, a reduction in the yellowness index between 7 and 15 was found in bleached pulps compared to the unbleached ones. Furthermore, the lowest yellowness index was that of the steam exploded pulps, suggesting that the steam explosion treatment contributes to yield pulps with less color and therefore closer to the ideal white.

CIE $L^*a^*b^*$ and CIE L^*C^* color coordinates were measured after the P stage in pulps obtained by the most efficient bleaching sequence, corresponding in all cases to those in which LMS was used. These results were compared with those of unbleached pulps, in order to evaluate color changes undergone during the biobleaching process, since the color appearance of paper is an important parameter in many different applications. Therefore, a numerical definition of color is essential for good quality control and for a good customer–producer relationship. Furthermore, good white base colors are necessary where products are to be dyed, printed, or otherwise colored. The brightness and full range of color in color printing depend to a large extent upon the whiteness of the base paper.

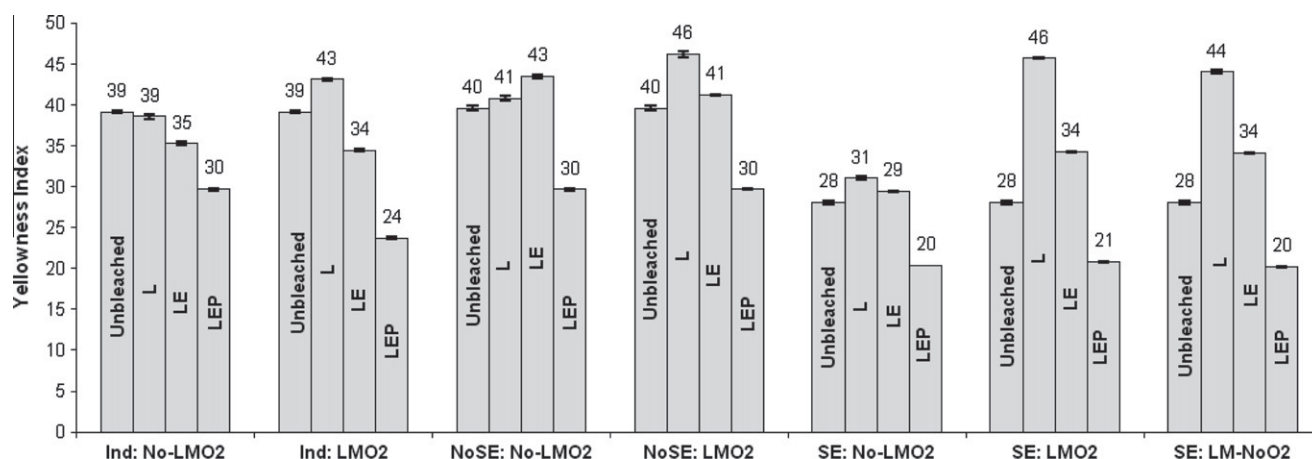


Fig. 4. Pulp yellowness for each stage in LEP sequences. L: laccase stage; E: alkaline extraction stage; P: hydrogen peroxide stage; Ind: industrial pulp; NoSE: control pulp without steam explosion pre-treatment; SE: steam exploded kraft pulp; No-LMO₂: no laccase, no mediator, no oxygen; LMO₂: laccase, mediator and oxygen; LM-NoO₂: laccase, mediator and no oxygen.

After a LEP bleaching sequence, all pulps increased L^* and decreased C^* (i.e. lightness increased and color decreased) compared to the unbleached pulps. However, although the decrease in color was lower for the SE:LMO₂ pulp (ΔC^* , 0.8 vs 2.9 and 4.7, for NoSE:LMO₂ and Ind:LMO₂, respectively), this pulp showed the lowest color (C^* , 11.2 vs 16.3 and 12.6 for NoSE:LMO₂ and Ind:LMO₂, respectively) and also the highest lightness (L^* , 91.9 vs 90.5 and 90.6 for NoSE:LMO₂ and Ind:LMO₂, respectively), suggesting that the steam explosion helped to produce pulps with better colorimetric coordinates. The LEP bleaching also decreased the a^* and b^* coordinates for the steam exploded pulp ($\Delta a^* = 4.1$ and $\Delta b^* = 0.3$), the control pulp ($\Delta a^* = 2.1$ and $\Delta b^* = 2.9$) and the industrial pulp ($\Delta a^* = 2.9$ and $\Delta b^* = 4.5$).

In Fig. 5, reflectance is plotted vs wavelength. The LEP bleaching sequence gets the unbleached pulps closest to the ideal white, i.e. 100% reflection of all wavelengths within the visible spectrum. Furthermore, the steam explosion pre-treatment resulted in higher reflectance for the bleached pulp (SE:LMO₂), in spite of the low reflectance observed with wavelengths above 440 nm before the bleaching process. Moreover, for wavelengths close to 457 nm (brightness measurement), the differences in reflectance between SE:LMO₂ and the other bleached pulps (NoSE:LMO₂ and Ind:LMO₂) were more pronounced, as the brightness values showed (Fig. 3). Based on these last results, it can be concluded that the combina-

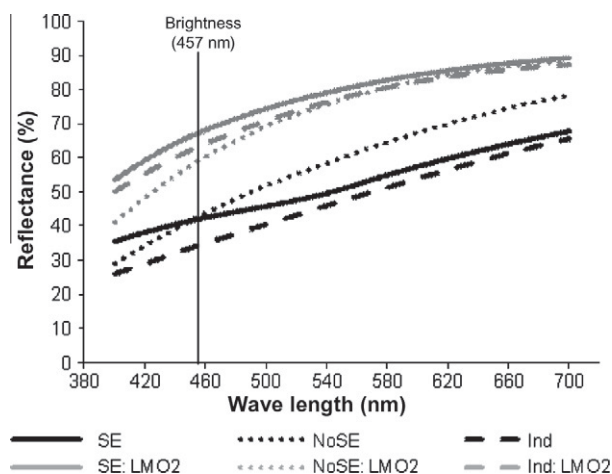


Fig. 5. Reflectance curves of pulps before and after LEP sequences. Ind is related to industrial pulp; NoSE: control pulp without steam explosion pre-treatment; SE: steam exploded kraft pulp; LMO₂: laccase, mediator and oxygen.

tion of steam explosion and LEP bleaching provided the most efficient bleaching process, yielding pulp with better colorimetric and optical properties.

3.2. Hydrogen peroxide consumption

Hydrogen peroxide consumption was assessed in all our experiments. Samples subjected to a steam explosion pre-treatment showed lower hydrogen peroxide consumption during the P stage (55.7–54.0%) than control pulps (77.6–66.8%) and industrial pulps (79.5–59.1%). Keeping in mind that hemicelluloses dissolve during the steam explosion pre-treatment and that acidic groups on xylan turn into hexenuronic acid during kraft pulping, there is reason to expect that exploded chips will yield pulps with less hexenuronic acid. In our experience, the hexenuronic acid content of the exploded pulp was 4 $\mu\text{mol/g}$, vs 30 and 37 $\mu\text{mol/g}$ in non-exploded and industrial pulps, respectively. According to Vuorinen et al. (1999) and Ragnar (2001), consumption of bleaching chemicals is minimum when the hexenuronic acid content of pulps is the lowest. Thus, a steam explosion pre-treatment, prior to kraft pulping, can be expected to reduce the chemical consumption in subsequent bleaching.

A logical consequence of lignin removal (kappa number reduction) in the LMS pre-treatment is less hydrogen peroxide use in a further bleaching stage: the lignin remaining in the pulp has been partially oxidized by the LMS and, as a consequence, the need for hydrogen peroxide is reduced. Consequently, when LMS was not used during the enzymatic treatment in our experiments, demands for hydrogen peroxide were higher (55.7% vs 54.0% for exploded pulps, 77.6% vs 66.8% for non-exploded pulps and 79.5% vs 59.1% for industrial pulps).

However, if no oxygen was added during this enzymatic treatment, hydrogen peroxide consumption decreased (51.2%). This finding is consistent with the outcomes in kappa number and optical properties, suggesting that the addition of oxygen is not essential since no saving on chemical reagent nor improvement in pulp quality was observed.

3.3. Accelerated ageing

Accelerated ageing of bleached pulps was conducted in order to evaluate the effect that steam explosion and laccase treatments had on the optical properties of pulps.

Yellowness index measurements are used primarily to study degradation of white color. The yellowing of paper caused by

Table 1

Influence of an accelerated ageing treatment in brightness and yellowness of industrial, control and exploded kraft pulps.

	Brightness			Yellowness		
	Original ^a	Aged ^b	Reduction	Original ^a	Aged ^b	Increase
Ind: No-LMO ₂	52.9	38.9	15.3	29.7	40.1	10.4
Ind: LMO ₂	63.3	44.7	19.3	23.7	35.4	11.7
NoSE: No-LMO ₂	57.5	53.1	4.5	29.7	31.8	2.2
NoSE: LMO ₂	59.2	54.9	4.3	29.7	31.4	1.8
SE: No-LMO ₂	66.0	60.8	5.2	20.4	23.6	3.2
SE: LM-NoO ₂	68.5	61.8	6.7	20.2	23.9	3.7
SE: LMO ₂	67.3	62.6	4.7	20.8	22.9	2.1

^a Before the accelerated ageing treatment.

^b After the accelerated ageing treatment.

ageing (from light exposure and/or high temperature and humidity) could be measured by assessing changes in the yellowness index.

Table 1 lists the yellowness index and the brightness before and after accelerated ageing of industrial, non-exploded and exploded bleached kraft pulps. Brightness reductions and yellowness index increments were observed in all bleached pulps after accelerated ageing, with a greatest impact on the industrial pulp treated with LMS.

Although, overall, the optical properties were more stable in exploded and non-exploded pulps than in the industrial pulp, the non-exploded pulp showed the lowest increase in yellowness. Nevertheless, optical properties were best in the exploded pulp, even after undergoing accelerated ageing, with the highest value in brightness and the lowest yellowness index. The different responses to accelerated ageing showed by pulps in our study could result from the interaction of multiple factors, such as the lignin, hexenuronic acid and hemicellulose contents (Vuorinen et al., 1999; Sevastyanova et al., 2005).

The effect of the LMS in the bleaching sequence can also be observed in Table 1. With the only exception of the industrial pulp, the enzymatic treatment provided pulps with more stable optical properties, reducing variations of brightness and yellowness. This effect was more pronounced in the exploded pulp, suggesting that the combination of both treatments could be more advantageous. Other authors have reported that the enzymatic treatment increases the brightness reversion (Cadena et al., 2010). However, it should be noted that their results were assessed after the alkaline extraction and not after the hydrogen peroxide stage, which could remove compounds that contribute to increase the brightness reversion.

Finally, when a control was run with no addition of oxygen in the laccase treatment (SE:LM-NoO₂), both the brightness and the yellowness index were less stable than those of pulps obtained with oxygen addition (SE:LM-O₂). Therefore, although oxygen did not improve pulp properties before ageing, as indicated above, there is a possibility that it could provide pulps with more stable properties.

4. Conclusions

Our results show that the LMS treatment boosted the subsequent chemical bleaching. Also, steam explosion prior to kraft pulping further improved bleaching. The combination of LMS and steam explosion took on the advantages of both pre-treatments and provided pulps with minimum kappa number and high-

est optical properties, even after accelerated ageing. In addition, this process resulted in a 20% reduction of hydrogen peroxide consumed.

The addition of oxygen during the enzymatic treatment did not improve significantly the properties of the bleached pulps but it could provide pulps with more stable properties.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via the Projects CTQ 2006-00385 and CTQ 2009-11268 and the FPI fellowship (BES2007-14528).

References

- Ahvazi, B., Radiotis, T., Bouchard, J., Goel, K., 2007. Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips. *J. Wood Chem. Technol.* 27 (2), 49–63.
- Cadena, E.M., Vidal, T., Torres, A.L., 2010. Influence of the hexenuronic acid content on refining and ageing in eucalyptus TCF pulp. *Bioresour. Technol.* 101, 3554–3560.
- Eugenio, M.E., Santos, S.M., Carbajo, J.M., Martín, J.A., Martín-Sampedro, R., González, A.E., Villar, J.C., 2010a. Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* 101, 1866–1870.
- Eugenio, M.E., Miranda, J., Martín-Sampedro, R., Villar, J.C., 2010b. Influence of laccase bleaching process variables on bleached pulps properties. In: *Proceeding of VI Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research (CIADICYP)*, Lisboa, Portugal, pp. 160–161.
- Fillat, A., Colom, J.F., Vidal, T., 2010. A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresour. Technol.* 101, 4104–4110.
- Jakobsons, J., Hortal, B., Erins, P., Sundquist, J., 1995. Characterization of alkali soluble fraction of steam exploded birch wood. *Holzforchung* 49, 51–59.
- Josefsson, T., Lennholm, H., Gellerstedt, G., 2001. Changes in cellulose supramolecular structure and molecular weight distribution during steam explosion of aspen wood. *Cellulose* 8, 289–296.
- Josefsson, T., Lennholm, H., Gellerstedt, G., 2002. Steam explosion of aspen wood. Characterization of reaction products. *Holzforchung* 53 (3), 289–297.
- Li, H., Saeed, A., Jahan, M.S., Ni, Y., Van Heiningen, A., 2010. Hemicellulose removal from hardwood chips in the pre-hydrolysis step of the kraft-based dissolving pulp production process. *J. Wood Chem. Technol.* 30, 48–60.
- Martín-Sampedro, R., Revilla, E., Martín, J.A., Eugenio, M.E., Villar, J.C., 2010. Evaluation of steam explosion as a pretreatment prior to kraft pulping of *Eucalyptus globulus* wood. In: *Proceeding of VI Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research (CIADICYP)*, Lisboa, Portugal, pp. 62–63.
- Moldes, D., Díaz, M., Tzanov, T., Vidal, T., 2008. Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresour. Technol.* 99, 7959–7965.
- Moldes, D., Cadena, E.M., Vidal, T., 2010. Biobleaching of eucalypt kraft pulp with a two laccase-mediator stages sequence. *Bioresour. Technol.* 101, 6924–6929.
- Oudia, A., Queiroz, J., Simoes, R., 2008. Potential and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 43, 144–148.
- Ragauskas, A.J., Nagy, M., Kim, D.H., Eckert, C.A., Hallett, J.P., Liotta, C.L., 2006. From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. *Indus. Biotech.* 2 (1), 55–65.
- Ragnar, M., 2001. On the importance of the structural composition of pulp for the selectivity of ozone and chlorine dioxide bleaching. *Nordic Pulp Pap. Res. J.* 16, 72.
- Robert, D., Bardet, M., Lapiere, D., Gellerstedt, G., 1988. Structural changes in aspen lignin during steam explosion treatment. *Cell. Chem. Technol.* 22, 221–230.
- Sevastyanova, O., Lindström, M.E., Gellerstedt, G., 2005. Influence of a bleaching sequence on the brightness stability of eucalyptus kraft pulp. *Appita* 251, 255.
- Valls, C., Vidal, T., Roncero, M.B., 2010. The role of xylanases and laccases on hexenuronic acid and lignin removal. *Process Biochem.* 45, 425–430.
- Van Heiningen, A., 2006. Converting a kraft pulp mill into an integrated biorefinery. *Pulp Pap. Can.* 107 (6), 141–146.
- Viikari, L., Ranua, M., Kantelinen, A., Linko, M., Sundquist, J., 1986. Biobleaching with enzymes. In: *Proceedings of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*, Stockholm, pp. 67–69.
- Vivekanand, V., Wived, P., Sharma, A., Sabharwal, N., Singh, R.P., 2008. Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2799–2804.
- Vuorinen, T., Fagerström, P., Buchert, J., Tenkanen, M., Teleman, A., 1999. Selective hydrolysis of hexenuronic acid groups and its application in ECF and TCF bleaching of kraft pulps. *Pulp Pap. Sci.* 25 (5), 155.

PUBLICACIÓN VI:

Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Carbajo, J.M., Villar, J.C.

Bioresource Technology. 2011. 102: 7183-7189.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping

R. Martín-Sampedro, M.E. Eugenio, J.M. Carbajo, J.C. Villar*

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA, Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2011

Received in revised form 14 April 2011

Accepted 18 April 2011

Available online 23 April 2011

Keywords:

Steam explosion

Biopulping

Laccase

White-rot fungi

Eucalyptus globulus

ABSTRACT

The effect of a pretreatment consisting of steam explosion (SE) followed by a laccase mediator system (LMS) stage on *Eucalyptus globulus* kraft pulping has been evaluated and compared with fungal pretreatments. Pretreatment with SE and LMS was more efficient than pretreatments using *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes* sp. I-62. Steam explosion not only improved the enzyme penetration into the wood chips and shortened the pulping process by 60%, but also extracted around 50% of the hemicelluloses which could be converted into value-added products. The optimal conditions for the LMS treatment were 3 h, 3 UA/g and 40 °C. Compared to SE, the SE/LMS treatment yielded an increase in delignification of 13.9% without affecting pulp properties, provided a similar screened kraft yield, and reduced consumption of chemical reagents Na₂S and NaOH by 11.5% and 6.3%, respectively. Therefore, SE/LMS is a promising pretreatment for converting the pulp mill into a forest bio-refinery.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biopulping is the biological pre-treatment of wood chips to modify wood composition such as lignin content, with the aim of facilitating fiber separation or lignin removal in a subsequent mechanical or chemical pulping process. The concept of biopulping is based on the ability of some white-rot fungi to degrade lignin selectively in the initial period of wood decay, leaving cellulose relatively intact (Bajpai et al., 2001; Ferraz et al., 2008; Mendonça et al., 2008). White-rot fungi are not only capable of producing lignin-degrading enzymes, but are also able to penetrate into the substrate to transport these enzymes into materials such as wood chips (Messner and Srebotnik, 1994).

Biotreatment could produce energy savings during defibration or refining steps, increase in delignification rate, decrease in alkali consumption, improve of pulp strength properties and reduce pulping time and bleaching chemical consumption (Bajpai et al., 2001; Islam et al., 2008; Mendonça et al., 2008; Messner and Srebotnik, 1994; Oriaran et al., 1990; Wolfaardt et al., 2004), but fungal growth can be slow, maintenance of aseptic and optimal conditions during the long treatment time is required and yield loss due to fungal degradation of polysaccharides can occur. Therefore, the direct application of enzymes on wood chips is being explored. It has been shown that enzymatic pre-treatments enhanced conventional mechanical and chemical pulping, reduced energy

consumption (Maijala et al., 2008; Ramos et al., 2004) and increased the extent of delignification (Dyer and Ragauskas, 2004; Jacobs-Young et al., 1998; Zhao et al., 2002).

One disadvantage of enzymes for biopulping is their low effectiveness due to difficulties in penetrating the chips (Grethlein, 1985). Therefore, enzymes have been applied to raw wood material which has previously been defibrated to a certain extent (Burton, 2001), or to chemical pulp in the bleaching process (Eugenio et al., 2010). Alternatively, a vacuum (Jacobs-Young et al., 1998) or pressure (Maijala et al., 2008; Pere et al., 2005) can be applied to facilitate enzyme penetration into the wood chips.

In the current study, steam explosion is being explored as a means to facilitate enzymes penetration. This process consists in the treatment of lignocellulosic materials with high-pressure steam followed by rapid decompression. The sudden release of pressure in the “explosion” results in fiber separation and physical rupture of the fiber walls. This open structure of the exploded chips not only increases the enzymatic hydrolysis of biomass for the production of fermentable sugars (Jurado et al., 2009; Ruiz et al., 2007; Wu et al., 1999), but also leads to easier and shorter kraft pulping, owing to the efficient diffusion of cooking liquor into the fibers (Ahvazi et al., 2007; Martín-Sampedro et al., 2011).

The enzymes used in biopulping include cellulases, hemicellulases (xylanases), pectinases and ligninolytic enzymes such as lignin peroxidases and manganese peroxidases. The laccase-mediator system (LMS), which is used for biobleaching, has usually only been used in combination with other enzymes for biopulping applications (Dyer and Ragauskas, 2004; Maijala et al., 2008; Petit-Conil et al., 2002). In the current study, LMS treatment

* Corresponding author. Tel.: +34 913476761; fax: +34 913476767.

E-mail address: villar@inia.es (J.C. Villar).

following steam explosion was carried out and results were compared with those of treatment with *Pycnoporus sanguineus* and *Trametes* sp. I-62 prior to kraft pulping of *Eucalyptus globulus* wood chips.

2. Methods

2.1. Raw materials and chemicals

All chemicals used were reagent-grade and were obtained from Merck (Barcelona, Spain), Panreac (Barcelona, Spain) or Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), except for 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS) purchased from Roche (Madrid, Spain).

E. globulus wood chips were kindly supplied by La Montañanesa pulp mill (Torraspapel group, Spain). The enzymes used in this work were Novozym 51003 (laccase) and Pulpzyme HC (xylanase) produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus* sp. and *Bacillus* sp. respectively. Both enzymes were supplied as donation by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

2.2. Enzymatic treatment

2.2.1. Steam explosion treatment

Before enzymatic treatment, *E. globulus* chips were subjected to steam explosion pre-treatment in order to facilitate the enzymes penetration into the chips. Steam explosion conditions were selected according to previous work (Martín-Sampedro et al., 2011) and consisted of cold water pre-extraction (16 h at 25 °C) followed by two steam explosion cycles of 10 and 3 min each. In each cycle, chips were treated with steam at 183 °C (10 kg/cm²) in a 26 L stainless steel vessel and discharged at 6 kg/cm² into a blowing tank. Then, steam exploded (SE) chips were washed with cold water and air-dried.

Water retention, or hydration capacity, of the chips was calculated as the weight of water absorbed by the chips after being immersed in water for 6 h, and expressed as grams of absorbed water per 100 g of dry wood.

2.2.2. Experimental design to optimize laccase-mediator treatment

Preliminary experiments had shown that LMS treatment at 40 °C with an oxygen pressure of 6 kg/cm² was efficient and these conditions were fixed in the experimental design, and thus laccase dose and the treatment time were the only independent variables. A 3² factorial design was used to examine the influence of the independent variables on a subsequent kraft pulping. The total number of experiments required for the considered experimental design was nine (Table 1). The LMS, consisting of the laccase enzyme (Novozyme 51003) and HBT (5 mM) as mediator, was applied at 40 °C and pH 6 (100 mM phosphate buffer) to the substrate with a solid-liquid ratio of 75 g/L. The laccase dose was expressed as units of laccase activity per gram of dry wood (UA/g) where 1 U of laccase activity was defined as the amount of laccase required

to convert 1 $\mu\text{mol/min}$ of ABTS to its cationic radical ($\lambda = 436 \text{ nm}$, $\epsilon_o = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 0.1 M phosphate buffer, pH 6 at 24 °C).

Assays were performed using steam exploded chips prepared as it was described in Section 2.2.1. The chips were placed into 500 mL pressurized reactors, 0.2 mL of 0.05% Tween 80 was added, and oxygen was introduced until reaching a pressure of 6 kg/cm². The reactors were submerged into a thermostatic bath to assure a constant temperature of 40 °C.

2.3. Inoculum preparation and fungal treatment

E. globulus chips were treated with the ligninolytic fungi, *P. sanguineus* and *Trametes* sp. I-62, obtained from Instituto Jaime Ferrán de Microbiología-CIB collection. The fungi were grown on 2% malt extract media plates supplemented with 2% agar at 28 °C for 7 days and stored at 4 °C. Media plugs overgrown with mycelium were used to start a preinoculum in sterilized liquid medium (plugs from one plate of 90 mm \varnothing per 200 mL of distilled water). Cultures were incubated at 28 °C on a rotary shaker at 100 rpm for 2 days. Two-hundred milliliter of the culture was used to inoculate 200 g of sterilized wood chips that were not steam exploded.

The effect of extraction with solvents on the biokraft process was studied with chips without any extraction steps (NoE), and chips extracted with hot water (W), acetone (AC) and acetone and then with hot water (AC + W), respectively. Each extraction was carried out for 36 h in a Soxhlet type extractor. After pre-extractions, chips were autoclaved and inoculated with the individual fungi. The biotreatments were performed in 2 L reactors equipped with a system that provide a flow of sterilized air into each reactor for 1 min each hour. Reactors were placed in a device rotating at 1.25 rpm for 1 min each hour. After 28 days at 28 °C, chips were washed with acetate buffer (pH 5.2) to remove the superficial mycelium. The decayed wood chips were air dried at room temperature, and their moistures were determined. The weight losses were calculated from the initial and final chips dry weights. Control samples (without fungi) of each extraction were also prepared.

2.4. Production of pulps

Chips not exposed to steam explosion, chips not treated with the fungi and chips treated enzymatically or fungi were subjected to kraft pulping in 1 L pressurized reactors. The pulping equipment consisted of four reactors placed into a 20 L rotary pressurized vessel that contained hot water for indirect heating. This rotary vessel had a jacket-type electrical heater controlled by a computer to set the cooking temperature. Cooking conditions were: 60 g of dry chips, 4 L/kg liquor-wood ratio, 16% active alkali, 20% sulfidity, 160 °C cooking temperature, and 60 min to maximum temperature. The time at maximum temperature was adjusted to reach an H-Factor of 450 and 180 for non-exploded and exploded chips respectively, to assure that the different control pulps had a similar kappa number. After each batch, the reactors were removed from the vessel, and the cooked chips were washed, disintegrated in a pulp disintegrator and screened through 0.2 mm slots. Rejects and accepted pulps dry weights were determined to calculate screened and total yields. Black liquors were titrated with HCl to determine consumption of chemical reagents (Na₂S and NaOH). The kappa number and viscosity were determined in the pulp samples according to ISO 302 and ISO 5351-2, respectively.

2.5. Preparation and testing of handsheets

Pulps obtained after steam explosion and enzymatic pre-treatment plus kraft pulping were used to evaluate the optical and mechanical paper properties. The degree of refining (Schopper-

Table 1
Experimental design to study the laccase treatment: values of independent variables.

Experiments	Time (h)	Laccase (UA/g)
1	1	3.0
2	1	16.5
3	1	30.0
4	3	3.0
5	3	16.5
6	3	30.0
7	5	3.0
8	5	16.5
9	5	30.0

Riegler) was determined according to ISO 5267-1 and handsheets were formed from these unrefined pulps according to ISO 5269-2. Apparent bulk density, tensile index and tear index were determined according to ISO 5270; brightness and opacity according to ISO 2470 and ISO 2471.

3. Results and discussion

3.1. Enzymatic treatment

3.1.1. Steam explosion treatment

To facilitate the enzymes penetration into the wood chips, a steam explosion (SE) pre-treatment was carried out. The water retention capacity of the chips increased after SE treatment from 67 to 272 g of water per 100 g of dry wood. This finding suggests that the accessibility of the exploded chips has been increased, which could also improve the diffusion of enzymes during a subsequent enzymatic treatment.

The effect of this pre-treatment on kraft pulping was evaluated comparing the average kappa number, viscosity, screened kraft yield and chemical consumption of the exploded samples with those of controls without steam explosion pre-treatment. A reduction in kappa number of 67.8% (15.7 vs 48.8 in control pulp) was observed, while the viscosity and the NaOH consumption were increased by 23.8% and 9.1% respectively, in agreement with other works (Ahvazi et al., 2007; Martín-Sampedro et al., 2011). Furthermore, screened kraft pulping yield was found higher for exploded sample (49.6%) than for control pulp (28.9%), even if the overall yield of the process (including steam explosion) is considered (39.3%). Control pulp has lower screened yield because non-exploded chips would need a longer pulping to reduce the amount of uncooked material (rejects), due to their less open structure compared to exploded chips.

3.1.2. Experimental design to study laccase-mediator treatment

The influence of the laccase dose and the treatment time in total and screened kraft yield, NaOH and Na₂S consumptions and kappa number and viscosity of the obtained pulps is shown in Fig. 1.

In Fig. 1a and b it can be observed that the highest total and screened kraft yields were found for longer treatment (5 h), although no clear correlation was observed between the treatment time and the kraft yields. Screened kraft yield decreased when the laccase dose increased, except for 1 h of treatment at the highest laccase dose. Therefore, when a LMS treatment was carried out for 5 h with a laccase dose of 3 UA/g the highest increase in screened kraft yield was found (2.8%) followed by the treatment with 16 UA/g of laccase during 5 h (2.3%). From these results it can be pointed out that to increase kraft yield, at least 5 h of enzymatic treatment were needed and that, even in this case, high laccase doses were detrimental.

NaOH consumptions during kraft pulping of the different laccase treated samples were lower than those of control samples (around 67% in most of the cases; Fig. 1c). When 5 h treatments were carried out with a laccase dose of 30 UA/g, the lowest NaOH consumption was observed (58%). However, Na₂S consumptions were found higher than those of control samples in most of the cases when high and medium laccase doses were used (Fig. 1d). For low laccase dose (3 UA/g), reductions in Na₂S consumption were observed. Therefore, laccase pre-treatment could reduce both NaOH and Na₂S consumptions during kraft pulping when a low laccase dose was used, but an increase in Na₂S consumption could take place for high laccase doses. An explanation for the reduction in chemicals needed after LMS treatment could be that lignin partially oxidized by the LMS would need less chemical input for solubilization whereas some chemicals have to be consumed dur-

ing kraft pulping if the laccase or the mediator have been joined to the fibers. Thus, when medium and high laccase doses were assayed, the increase in the chemical consumption was higher than the reduction due to the enzymatic oxidation of lignin, resulting in an increase in chemical consumption.

A higher delignification after kraft pulping was found in LMS pretreated samples (Fig. 1e) without a strong degradation of the fibers, since differences in viscosity lower than 10% were observed when treated and exploded pulp are compared (Fig. 1f). The highest delignification was achieved when the pre-treatment was carried out for 3 h with a laccase dose of 3 UA/g of dry wood, obtaining an unbleached pulp with a kappa number of 13.7, which means an increase in delignification of 13.9% (compared to kappa number of exploded control pulp: 16.0). When a longer treatment was carried out with the same laccase dose, lower but significant kappa number reduction was observed (14.8 vs 16.0). Significant delignification was also found when laccase dose was 16.5 UA/g, independently of the treatment time, obtaining pulps with kappa number between 14.2 and 14.4 (increase in delignification of 10.0–11.1% compared to exploded control pulps). However, for high laccase dose (30 UA/g) and treatment times of 3 and 5 h, the kappa number of the resulting kraft pulps was higher than those of exploded control pulps. This observation indicates possible grafting of the LMS onto the pulp fiber (Dyer and Ragauskas, 2004). Thus use of a low laccase dose requires an enzymatic treatment of at least 3 h; whereas with a medium dose, 1 h of treatment was enough to increase delignification after kraft pulping. Treatments in the presence of higher laccase for more than 1 h of treatment had a negative effect on kappa number.

Fig. 2 shows the mechanical and optical properties of the handsheets formed from the unrefined pulps obtained using the steam explosion and enzymatic pre-treatment plus kraft pulping. All pulps presented a degree of refining of 15° Schopper-Riegler and no big differences (lower than 4%) were observed in apparent bulk density (around 0.39 g/cm³). Tensile and tear indexes were similar to those of exploded control pulps in most of the cases, but slightly higher variation for 1 h treatments was observed. Contrarily, Petit-Conil et al. (2002) observed an increase in mechanical properties when spruce chips were treated with LMS prior to thermo-mechanical pulping (TMP), likely due to the different behavior of softwood and hardwood and the different pulping process used by these authors.

Regarding to optical properties, a change in opacity often relates to a change in the brightness of the paper (darker paper shows higher opacity), but opacity is also related to the light scattering ability of paper (Maijala et al., 2008). Although treated samples presented optical property values close to those of exploded control samples, opacity tended to decrease when laccase doses and treatment times were increased, except for 5 h treatments. In contrast, brightness showed a slight increase with treatment time in most of the cases, but no with laccase dose, as the highest brightness (one point higher than control) for a medium laccase dose (16.5 UA/g) at 5 h was obtained. Therefore, despite the highest delignification after 3 h in the presence of 3 UA/g, these conditions did not cause a change in brightness compared to that of the control. This finding is in concordance with that reported by Dyer and Ragauskas (2004) who found that LMS treated chips were darker than control chips before pulping, but these color differences were no longer apparent in most of the resulting pulps after kraft pulping.

Therefore, when LMS treatment with 3 UA/g at 40 °C for 3 h was carried out after a steam explosion treatment and prior to kraft pulping of *E. globulus*, pulps with a lower kappa number than that of exploded control pulp (reduction of 2.3 units) could be obtained. This treatment showed no negative effects on mechanical and optical properties, resulted in screened kraft yields similar to those

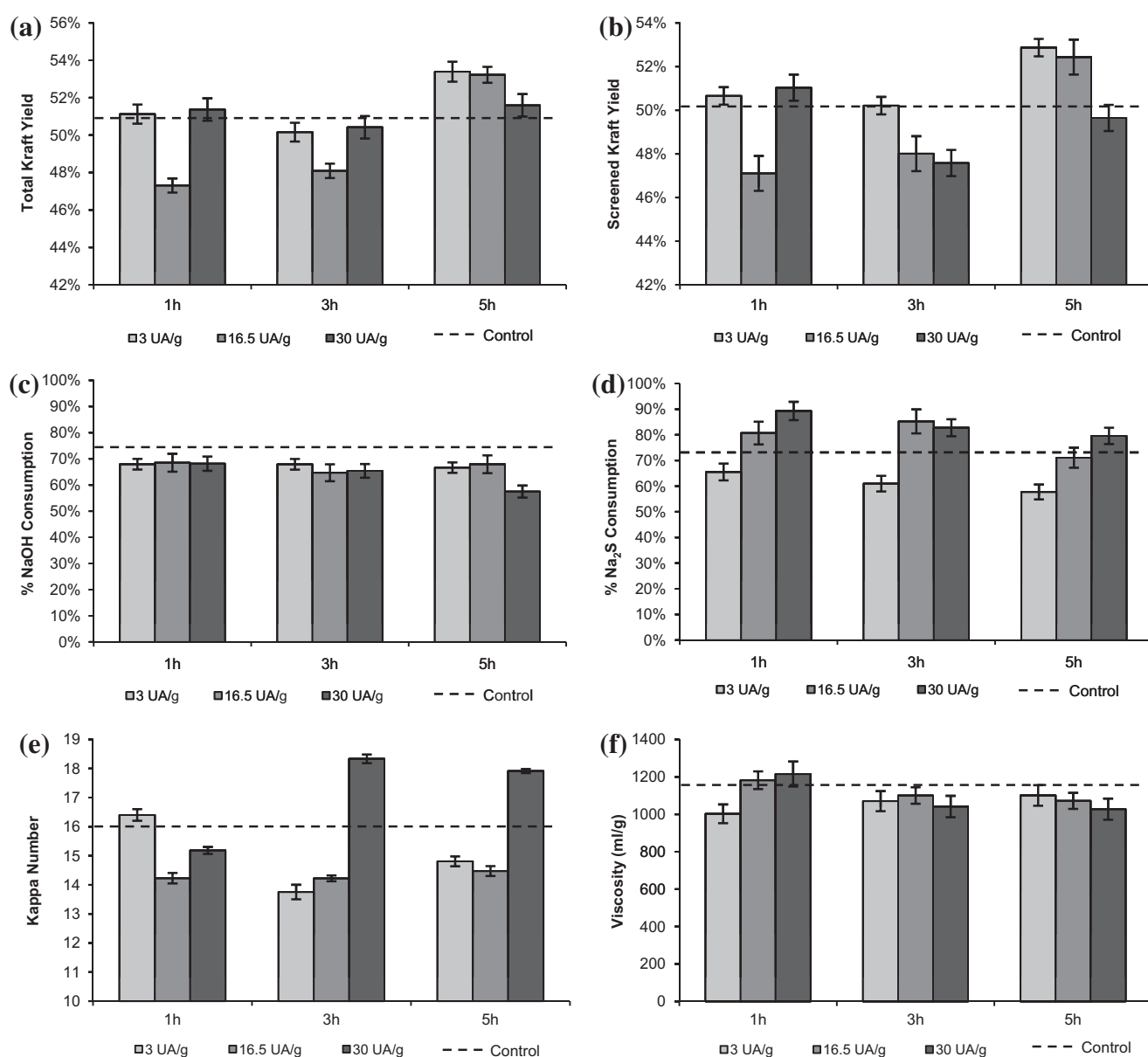


Fig. 1. Total and screened kraft yield, NaOH and Na₂S consumptions and kappa number and viscosity of exploded kraft pulps pretreated with laccase-mediator system at different laccase doses and treatment times. Exploded kraft pulp without any enzymatic treatment was used as control. Error bars show the standard deviation of three replicates.

obtained with exploded control sample, and reduced Na₂S and NaOH consumption by 11.5% and 6.3%, respectively. The observed increase in delignification (13.9%) was higher than the 8.7% reported by Dyer and Ragauskas (2004) when laccase-HBT treatment at 45 °C was carried out for 2 h prior to kraft pulping of *Pinus taeda*. This higher delignification could be due to small differences in the conditions of the laccase treatment and/or to different behavior of hardwood and softwood, but more likely, it may be due to the addition, in our case, of the steam explosion pre-treatment prior to the enzymatic treatment. Such a treatment improves reagent diffusion into the chips in kraft pulping (Ahvazi et al., 2007; Martín-Sampedro et al., 2011) and enhances enzymatic hydrolysis of biomass (Jurado et al., 2009; Ruiz et al., 2007; Wu et al., 1999). Furthermore, due to the reduction in kappa number as a consequence of only using a steam explosion treatment prior to kraft pulping (67.8%), the total improvement in delignification including the enzymatic treatment (13.9%) rose by up to 72.4%. In other words, when both pre-treatment were combined, pulping time

could be shortened from 60 to 25 min and a kraft pulp with even lower kappa number than that of control pulp was obtained. Therefore, the pulp productivity increased and the subsequent bleaching process might consume fewer chemical reagents. As a result, steam explosion followed by LMS treatment seems to be a promising concept for selective delignification and chemical savings.

3.2. Fungal treatment

In order to compare the results obtained with steam explosion plus LMS pre-treatment with those obtained using a more common biopulping process, *E. globulus* chips that had not undergone steam explosion treatment, but were extracted with acetone and/or water were treated with the ligninolytic fungi, *P. sanguineus* and *Trametes* sp. I-62.

The effects of extractions without fungal inoculation on the kraft process and pulp quality are shown in Table 2. When an ace-

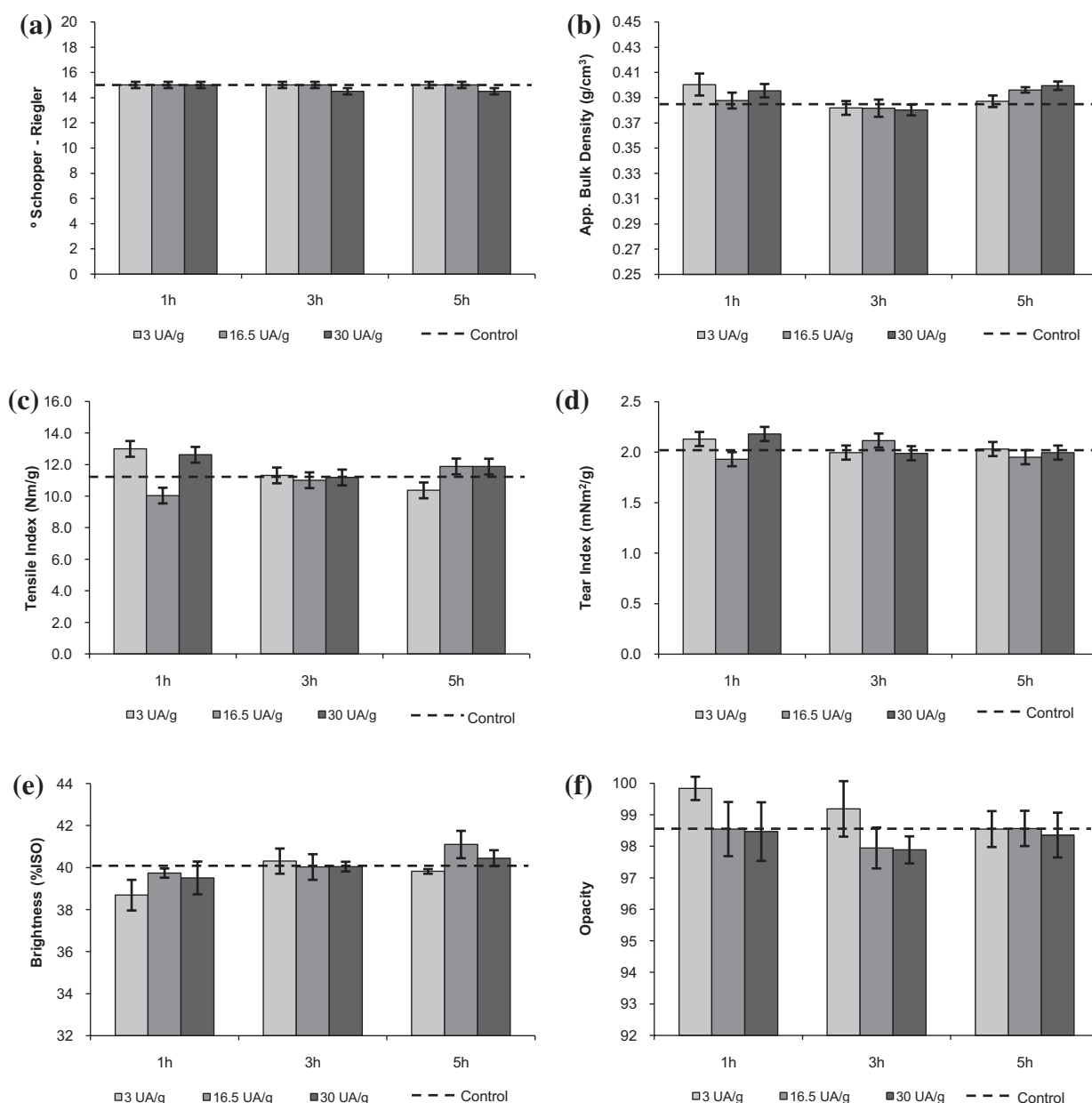


Fig. 2. Mechanical and optical properties of exploded kraft pulps pretreated with laccase-mediator system at different laccase doses and treatment times: (a) Schopper–Riegler degree, (b) apparent bulk density, (c) tensile index, (d) tear index, (e) brightness and (f) opacity. Exploded kraft pulp without any enzymatic treatment was used as control. Error bars show the standard deviation of three replicas.

Table 2
Influence of different extractions on the pulp quality and on the kraft process.

	Kappa number	Δ Kappa (%)	Δ Viscosity (%)	Kraft yield ^a (%)	Δ Kraft yield	Chemical Consumption	
						$\Delta\%Na_2S$	$\Delta\%NaOH$
NoE	15.6			49.9			
AC	15.0	−4.1 ^b	+12.1 ^b	55.9	+6.0 ^b	−3.7 ^b	−1.9 ^b
W	11.0	−29.4 ^b	+5.9 ^b	51.8	+1.9 ^b	+7.0 ^b	+0.3 ^b
AC + W	11.3	−27.6 ^b	+13.1 ^b	51.9	+2.1 ^b	−0.4 ^b	−0.5 ^b

^a Screened kraft yield in pulping process, without including pre-treatment.

^b Compared to control without any extraction (NoE).

tone extraction was carried out, the yield in kraft pulping increased while both kappa number and chemical consumption decreased. However, the reduction in kappa number was higher when a water extraction was performed, as an increase in delignification of 29.4%

after the kraft process was obtained. When an acetone extraction was carried out before water extraction, the reduction observed in kappa number was almost the same as in the case of only water extraction. These findings could be explained by improved liquor

Table 3

Influence of fungal treatment on the pulp quality and on the kraft process compared with control with the same extraction but without fungal inoculation.

	Kappa number	Δ Kappa (%)	Δ Viscosity (%)	Kraft yield ^a (%)	Δ Kraft yield	Chemical Consumption	
						$\Delta\%$ Na ₂ S	$\Delta\%$ NaOH
NoE – P	15.8	+0.8 ^b	+2.1 ^b	49.8	–0.1 ^b	+2.6 ^b	+0.2 ^b
NoE – T	14.2	–9.3 ^b	+3.4 ^b	48.4	–1.5 ^b	+5.9 ^b	+0.5 ^b
AC – P	14.5	–3.7 ^b	–5.1 ^b	51.9	–4.0 ^b	+4.3 ^b	+1.7 ^b
AC – T	13.6	–9.5 ^b	–15.0 ^b	53.3	–2.6 ^b	+5.6 ^b	+2.4 ^b
W – P	11.9	+7.9 ^b	+1.6 ^b	50.0	–1.8 ^b	–3.4 ^b	+0.3 ^b
W – T	10.8	–2.0 ^b	–1.8 ^b	50.4	–1.4 ^b	+0.5 ^b	+0.9 ^b
AC + W – P	12.4	+9.0 ^b	–20.4 ^b	51.6	–0.3 ^b	+5.7 ^b	+1.2 ^b
AC + W – T	12.5	+10.2 ^b	–3.0 ^b	52.4	+0.5 ^b	+4.9 ^b	+1.4 ^b

^a Screened kraft yield in pulping process, without including pre-treatment.^b Compared to control with the same extraction but without fungal inoculation.

penetration and increased delignification during kraft pulping as a result of the extractions (Ferraz et al., 2008). Furthermore, hydrolysis of polysaccharides, which takes place during hot water extraction, could facilitate delignification.

A comparison of the outcomes of 28 days fungal treatments of extracted and non-extracted chips is provided in Table 3. Small differences were found in screened kraft yield during the pulping of biotreated chips compared to their controls; however, when weight losses during the fungal treatment were taking into account, the overall yields for biotreated pulps were around 5% lower than those of control pulps due to fungal degradation of polysaccharides. Nevertheless, in most cases, biotreated pulps showed a lower kappa number than their controls.

NaOH and particularly Na₂S consumptions were higher for biotreated samples compared to their controls. Despite these disadvantages, biotreatment with *Trametes* sp. I-62 promoted the pulping process, since this pre-treatment produces pulps with a lower kappa number than those of control pulps in all cases, apart from the AC + W samples. In contrast, *P. sanguineus* treatment did not result in an increase in delignification under the assay conditions, contrary to what was reported by Wolfaardt et al. (2004). The reason could be differences in the *P. sanguineus* strains. These differences have been observed previously in other white rot fungi (Akhtar et al., 1992; Blanchette et al., 1992). Biotreated pulps showed a viscosity similar to that of their controls in most of the cases.

When comparing biotreated and controls pulps that had undergone the same extraction process, the highest reductions in kappa number due to fungal treatment were observed in samples subjected to acetone extraction and without any extractions. In these samples, fungal colonization and laccase activity were also higher (data not shown). Overall, the lowest kappa number was observed in pulp obtained from chips pre-extracted with hot water and treated with *Trametes* sp. I-62.

3.3. Comparison between steam explosion plus LMS treatment and fungal treatment

The most efficient biotreatment assayed in this study consisted of a steam explosion treatment followed by a LMS treatment at 40 °C for 3 h with a laccase dose of 3 UA/g, as can be concluded from data presented in Section 3.1.2. This enzymatic pretreatment with LMS resulted in a lower kappa number and chemical consumption than steam explosion and xylanase pre-treatment in preliminary studies and in studies reported by Zhao et al. (2002) after soda pulping of xylanase pretreated wheat straw.

Steam explosion plus enzymatic treatment was more efficient in term of treatment times, delignification, chemical savings and pulp yield. Similar results were found by Ramos et al. (2004) who compared an enzymatic treatment using crude extracts of

Phanerochaete chrysosporium with direct fungus treatment prior to thermomechanical pulping (TMP) and chemithermomechanical pulping (CTMP).

Taking into account that during steam explosion pre-treatment, most of the hemicelluloses are removed before pulping, the overall pulp yield of the process (including pre-treatments and kraft pulping) would be reduced by about 40%, but pulp production of a hypothetical mill could be maintained at a similar level because of the reduction in pulping time. Moreover, the hemicelluloses are removed without excessive degradation and could be converted into value-added products, increasing the total revenue stream for the pulp industry and converting the pulp mill into an integrated forest bio-refinery (Martín-Sampedro et al., 2011; Van Heiningen, 2006). This potential could be one of the main advantages of a combined steam explosion and LMS treatment compared to fungal treatment, in which polysaccharides are degraded.

4. Conclusions

Steam explosion followed by LMS treatment seems to be a promising pretreatment for increasing the delignification rate in the biopulping process since pulping times could be shortened by 60%, and most of the hemicelluloses could be extracted before pulping and converted into a value-added product. The optimal conditions assayed for LMS were 3 UA/g and 3 h of treatment at 40 °C. Compared with fungal treatment, lower kappa number and chemical consumptions were observed, and less polysaccharides degradation took places as shown by better kraft yields.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via the Projects CTQ 2006-00385 and CTQ 2009-11268 and the FPI fellowship (BES2007 – 14528).

References

- Ahvazi, B., Radiotis, T., Bouchard, J., Goel, K., 2007. Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips. *J. Wood Chem. Technol.* 27 (2), 49–63.
- Akhtar, M., Attridge, M.C., Myers, G.C., Kirk, T.K., Blanchette, R.A., 1992. Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *Tappi J.* 75 (2), 105–109.
- Bajpai, P., Bajpai, P.K., Akhtar, M., Jauhari, M.B., 2001. Biokraft pulping of Eucalyptus with selected lignin-degrading fungi. *J. Pulp Paper Sci.* 27 (7), 235–239.
- Blanchette, R.A., Burnes, T.A., Eerdmans, M.M., Akhtar, M., 1992. Evaluating isolates of *Phanerochaete chrysosporium* and *Ceriporiopsis subvermispora* for use in biological pulping processes. *Holzforschung* 46, 109–115.
- Burton, S.W., 2001. Low energy thermomechanical pulping process using an enzyme treatment between refining zones. Patent US 6267841.
- Dyer, T.J., Ragauskas, A.J., 2004. Laccase: a harbinger to kraft pulping. *ACS Sym. Ser.* 889, 339–362.
- Eugenio, M.E., Santos, S.M., Carbajo, J.M., Martín, J.A., Martín-Sampedro, R., González, A.E., Villar, J.C., 2010. Kraft pulp biobleaching using an extracellular

- enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour. Technol.* 101, 1866–1870.
- Ferraz, A., Guerra, A., Mendonça, R., Masarin, F., Vicentim, M.P., Aguir, A., Pavan, P.C., 2008. Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. *Enzyme Microb. Tech.* 43, 178–185.
- Grethlein, H.E., 1985. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Nat. Biotechnol.* 3, 155–160.
- Islam, M.N., Karim, M.R., Malinen, R.O., 2008. Beneficial effects of fungal treatment before pulping and bleaching of *Acacia mangium* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Turk. J. Agric. For.* 32, 331–338.
- Jacobs-Young, C., Heitmann, J.A., Venditti, R.A., 1998. Conventional kraft pulping using enzyme pre-treatment technology: role of chip thickness, specie and enzyme combinations. *AIChE Annual Meeting on the Innovative Advances in the Forset Products Industries*. Los Angeles (EEUU). 94 (319), 1–15.
- Jurado, M., Prieto, A., Martínez-Alcalá, A., Martínez, A.T., Martínez, M.J., 2009. Laccase detoxification of steam-exploded wheat Straw for second generation bioethanol. *Bioresour. Technol.* 100, 6378–6384.
- Maijala, P., Kleen, M., Westin, C., Poppius-Levlin, K., Herranen, K., Lehto, J.H., Reponen, P., Mäentausta, O., Mettälä, A., Hatakka, A., 2008. Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Enzyme Microb. Tech.* 43, 169–177.
- Martin-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Revilla, E., Martin, J.A., Villar, J.C., 2011. Integration of kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment. *Bioresources* 6 (1), 513–528.
- Mendonça, R., Jara, J.F., González, V., Elissetche, J.P., Freer, J., 2008. Evaluation of the White-rot fungi *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvermispore* in biotechnological applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1323–1330.
- Messner, K., Srebotnik, E., 1994. Biopulping: an overview of developments in an environmentally safe paper-making technology. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 351–362.
- Oriaran, T.P., Labosky, P., Blankenhorn, P.R., 1990. Kraft pulp and papermaking properties of *Phanerochaete chrysosporium* degraded aspen. *Tappi J.* 73, 147–152.
- Pere, J., Ellmen, J., Viikari, L., 2005. Process for preparing mechanical pulp. Patent WO/2005/056915.
- Petit-Conil, M., Semar, S., Niku-Paavola, M.-L., Sigoillot, J.C., Asther, M., Anke, H., Viikari, L., 2002. Potential of laccases in softwood-hardwood high-yield pulping and bleaching. *Prog. Biotechnol.* 21, 61–71.
- Ramos, J., Rojas, T., Navarro, F., Davalos, F., Sanjuan, R., Rutiaga, J., Young, R.A., 2004. Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. *J. Agri. Food Chem.* 52, 5057–5062.
- Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, M., Castro, E., 2007. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme Microb. Tech.* 42, 160–166.
- Van Heiningen, A., 2006. Converting a kraft pulp mill into an integrated biorefinery. *Pulp Pap. Can.* 107 (6), 141–146.
- Wolfaardt, F., Taljaard, J.L., Jacobs, A., Male, J.R., Rabie, C.J., 2004. Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips. *Bioresour. Technol.* 95, 25–30.
- Wu, M.M., Chang, K., Gregg, D.J., Boussaid, A., Beatson, R.P., Saddler, J.N., 1999. Optimization of steam explosion to enhance hemicelluloses recovery and enzymatic hydrolysis of cellulose in softwoods. *Appl. Microbiol. Biot.* 77–79, 47–54.
- Zhao, J., Li, X., Qu, Y., Gao, P., 2002. Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat Straw. *Enzyme Microb. Tech.* 30, 734–740.

PUBLICACIÓN VII:

Effect of steam explosion and enzymatic pre-treatments on pulping and bleaching of *Hesperaloe funifera*.

Martín-Sampedro, R., Eugenio, M.E., Villar, J.C.

Manuscrito

Effect of steam explosion and enzymatic pre-treatments on pulping and bleaching of *Hesperaleo funifera*

Martín-Sampedro, R.^a; Eugenio, M.E.^a, and Villar, J.C.^{a*}

^a Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA. Carretera de la Coruña, km 7.5, 28040, Madrid (Spain)

*Corresponding author: villar@inia.es; phone number: (+34) 913476761; fax number: (+34) 913476767

Abstract

A non-wood raw material with high potential for pulp and paper applications (*Hesperaleo funifera*) was subjected to a steam explosion pre-treatment, and the subsequent effect of this pretreatment on biopulping and biobleaching was studied. An increase in the delignification rate, bigger than that reported for autohydrolysis and acid hydrolysis pre-treatments, and a reduction in chemical consumption were found during kraft pulping of the exploded samples. However, biopulping with the laccase-mediator system (LMS) did not lead to a reduction in the kappa number in either non-exploded or exploded unbleached pulps. On the other hand, the steam explosion pretreatment boosted the advantages of the LMS pre-treatment (decrease in kappa number and increase in brightness) favored biobleaching, with a 53.1% delignification rate and a final brightness of 67 % ISO. Finally, the steam explosion pre-treatment also improved the color properties of the bleached pulp and reduced the hydrogen peroxide consumption by 24.6%.

Keywords:

Hesperaleo funifera; Biopulping; Biobleaching; Steam explosion; Laccase.

1. Introduction

One of the main goals of research in pulp and paper industry is to achieve a sustainable development by using new eco-friendly technologies that improve pulping and bleaching processes, optimize energy and chemical consumption and ensure an appropriate use of resources. This objective could be reached by using biotechnology (biopulping and biobleaching) and new raw materials such as agricultural residues and non-woody plants rather than wood fiber. The advantages of the use of non-wood raw materials include: 1) the added value given to agrifood crops by exploiting their residues; 2) the availability of these materials in countries with limited forest resources; 3) the ability to obtain large amounts of special paper by virtue of the wide variability in morphology and chemical composition of non-wood fibers; and 4) the reduced consumption of chemicals and energy in cooking and bleaching operations by effect of the more porous and readily accessible tissue structure of non-wood raw materials (Alaejos et al. 2004; Sanchez et al. 2011). These advantages have brought about a 14.6% increase in the production of cellulose pulp from non-wood raw material in the period 2000-2009, while the production of cellulose pulp from wood has decreased by 6.9% in the same period. Despite this fact, in 2009, the pulp production from non-wood materials represented only an 8.4% of the total production in the same year (FAO 2011), probably due to the high ash and extractive contents of these materials, which contribute to a low pulping yield. Other disadvantages of non-wood raw materials are: low density, which complicates transportation; the need of specific environmental growing conditions; and problems derived from a very short harvest period.

A promising non-wood raw material is *Hesperaloe funifera*, native to the Chihuahuan desert of Northern Mexico. McLaughlin (2000) has evaluated its potential as a papermaking raw material and has reported that its pulps are as good as high-cost pulps (softwood kraft or abaca and sisal soda-anthraquinone pulps). Due to its low-irrigation requirement, *H. funifera* grows in areas with scant water resources; and its low lignin content increases the odds of reducing energy and chemicals consumption during the pulping process.

Some authors have explored the potential of *H. funifera* as raw material for pulp production (Fairbank and Detrick 2000; McLaughlin 2000; Revilla et al. 2010; Sanchez et al. 2010a; Sanchez et al. 2010b; Wong and McLaughlin 2000), however only

Sanchez et al. (2011) have evaluated the effect of some pretreatments, such as acid hydrolysis and autohydrolysis, on pulping of this non-wood raw material.

There have been no reports on the application of the steam explosion pretreatment to *H. funifera*. However, some studies have shown that the cooking liquor diffuses more freely into the open structure of steam exploded chips of wood raw materials, leading to easier and shorter kraft pulping (Ahvazi et al. 2007; Martin-Sampedro et al. 2011a). Moreover, hemicelluloses removed during the steam explosion pretreatment can be further converted into value-added products (Li et al. 2010), without a significant reduction of the black liquor's calorific power, and increasing the total revenue of the pulp mill as a final result (Ragauskas et al. 2006; Van Heiningen 2006). In addition, exploded-kraft pulps have showed better optical properties and lower hexenuronic acid content than control pulps (non-exploded) (Martin-Sampedro et al. 2011a), which contributes to an easier bleaching process (Josefsson et al. 2002; Martin-Sampedro et al. 2011b). Based upon all these facts, the study of how steam explosion affects a non-wood raw material characterized by a less compact and more porous structure than wood raw materials is of great interest.

On the other hand, the use of biological pre-treatments to boost pulping and bleaching processes has attracted considerable interest in the last two decades. Most studies of biopulping have examined the direct application of fungi to chips. However, this approach has many disadvantages for industrial use, such as slow fungal growth, the difficulty of keeping aseptic and optimal conditions during the long treatment required, and yield loss due to the degradation of polysaccharides simultaneous to lignin degradation. In an attempt to overcome these issues, the direct application of enzymes, such as xylanases, laccases or manganese peroxidases, to wood chips has been suggested as a more attractive alternative for industrial purposes. Nevertheless, in view of the fact that penetration of the wood chips by these enzymes is rather difficult, researchers have recommended pre-treating the chips by means of defibration (Burton 2001), vacuum (Jacobs-Young et al. 1998), compression (Maijala et al. 2008; Pere et al. 2005) or steam explosion (Martin-Sampedro 2011c) in order to open their structure. An alternative option is to use a raw material more readily accessible, with a more porous structure, such as non-wood materials (Qin et al. 2006; Ramos et al. 2004; Zhao et al. 2002). Although, as mentioned above, some studies have tested the biopulping of a non-wood

raw material, we found no studies reporting on the use of *H. funifera* with (or without) a steam explosion pre-treatment.

In order to boost the bleaching process, many researchers have pretreated pulps with enzymes, mainly with the laccase-mediator system (LMS), before applying the standard bleaching sequences (Viikari et al. 1986; Moldes et al. 2008; Eugenio et al. 2010). These biobleaching studies have shown that enzymatically pretreated pulps require a smaller amount of chemicals in subsequent bleaching processes, maintain or increase the pulp quality, and reduce the pollutant load of the effluents. According to Martin-Sampedro et al. (2011b), the combination of LMS and steam explosion takes on the advantages of both pretreatments when *Eucalyptus globulus* is used as raw material, providing pulps with minimum kappa number and optimum optical properties and consuming 20% less hydrogen peroxide compared to control pulps.

Building on this base of evidence, and keeping in mind that our overall goal as researchers is to develop new eco-friendly technologies that save energy (reducing the pulping time) and chemicals and ensure an appropriate utilization of resources, our study was designed to evaluate how steam explosion impacts both the biopulping and the biobleaching of *H. funifera*. In this work we used a non-wood raw material with potential pulp and paper applications and combined traditional pulp processes with enzymatic treatments that, boosted by the steam explosion pre-treatment, could increase their benefits and the viability of their industrial application.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and raw materials

All chemicals used were reagent-grade and were supplied by Merck (Barcelona, Spain), Panreac (Barcelona, Spain) or Sigma–Aldrich (Madrid, Spain), except for 2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate (ABTS), which was purchased from Roche (Madrid, Spain).

The laccase used in enzymatic treatments (Novozym 51003) was produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus* sp., and was donated by Novozymes (Bagsvaerd, Denmark).

H. funifera was kindly provided by the University of Valencia (Spain). Its chemical composition was analyzed: ash content (TAPPI T 211 om-93), hot water extractives (TAPPI T 207 om-93), ethanol extractives (TAPPI T 204 om-88) and lignin (TAPPI T 222 om-88). Fiber length was measured by projection and fiber width was directly measured from the pulp suspension using a microscope with a Visopan screen.

2.2. Steam explosion treatment

H. funifera was subjected to two different steam explosion pre-treatments, summarized in Table 1. The SE2 conditions were selected based on a previous report (Martin-Sampedro et al. 2011a), in which this treatment provided, among all the conditions assayed, the most accessible structure of *Eucalyptus globulus*. However, since non-wood raw materials have a less compact and more porous structure than wood, it is reasonable to expect them to be more readily accessible (Sanchez et al. 2011) and to require a less intensive steam explosion pretreatment. Thus, the SE1 treatment consisted of one steam explosion cycle of 3 min, instead of the two cycles of the SE2 treatment. In each cycle, *H. funifera* was treated with steam at 183 °C (10 kg/cm²) in a 26-L stainless steel vessel and discharged into a blowing tank at 6 kg/cm². The exploded samples were then removed from the blowing tank, washed with cold water, air-dried, and finally weighted. The water content was measured to determine the total yield of the steam explosion.

The severity factor of each treatment was calculated using this equation inferred by Overend and Chornet (1987), in which T is the temperature (°C) and t the duration of the treatment (min).

$$S_0 = \log \left(e^{\frac{T-100}{14.75} \cdot t} \right) \quad (1)$$

The water retention, or hydration capacity, of the chips was calculated as the weight of water absorbed by the chips after being immersed for 6 hours, and it was expressed as grams of water per 100 grams of dry sample.

2.3. Biopulping process

The biopulping process assayed consisted of applying a laccase mediator system (LMS) followed by kraft pulping.

2.3.1. Laccase mediator system treatment

The laccase used was Novozym 51003. The enzyme dose was expressed as units of laccase activity per gram of dry wood (UA/g), where 1 U of laccase activity is defined as the amount of laccase required to convert 1 μmol / min of ABTS to its cationic radical ($\lambda_{\text{max}}=436\text{nm}$, $\epsilon=49600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, 0.1M phosphate buffer, pH 6 at 24 °C).

The mediator used was 1-hydroxybenzotriazole (HBT), based on Dyer and Ragauskas (2004), who reported that using HBT as mediator in LMS biopulping of *Pinus tadea*, versus other mediators such as violuric acid (VA) and ABTS, resulted in the lowest kappa number.

All assays were performed in duplicate in 500 ml pressurized reactors, using 40 g of non-exploded or exploded samples. The reactors were placed in a thermostatic bath at 40°C for 5 hours. Phosphate buffer (100 mM) was used to keep the pH at 6. Consistency, laccase dose, mediator concentration and oxygen pressure were 7%, 30 UA/ g dry sample, 5 mM and 6 Kg/cm², respectively. Also, a few drops of 0.05% Tween 80 were added. Control assays were performed skipping the addition of laccase and mediator in the enzymatic treatment (control-buffer), and removing the whole enzymatic treatment step from the process (control).

2.3.2. Kraft pulping

Enzymatically treated samples (both exploded and non-exploded) were subjected to kraft pulping in 1-L pressurized reactors. Control samples (without the LMS stage) and control-buffer samples (only buffer addition, without laccase and HBT) were also pulped in a similar manner. The pulping equipment consisted of four reactors placed into a 20-L rotary pressurized vessel that contained hot water for indirect heating of the reactors. This rotary vessel had a jacket-type electrical heater controlled by a computer to set and maintain the cooking temperature. Cooking conditions were: 60 g of dry chips, a liquor to wood ratio of 6 L/kg, 16% active alkali (AA), 20% sulfidity (S), 160 °C cooking temperature, 50 min to maximum temperature and 23 min at maximum temperature.

After each batch, the reactors were removed from the vessel, and the cooked chips were washed, disintegrated and screened to determine their reject content and

screened and total yields. Black liquors were titrated with HCl to determine the chemical reagents consumption. The kappa number (ISO 302) and viscosity (ISO 5351-2) were determined in the pulp samples.

2.4. Biobleaching process

The biobleaching process assayed consisted of a laccase mediator system (LMS) treatment followed by a conventional TCF bleaching sequence (alkaline extraction plus hydrogen peroxide bleaching).

2.4.1. Laccase mediator system treatment (L)

Novozym 51003 was the laccase used in these assays and the natural mediator was acetosyringone. This natural mediator was selected for the biobleaching pre-treatment based on Eugenio et al. (2010), who evaluated acetosyringone and HBT as mediators in biobleaching of *E. globulus* and determined acetosyringone to be the most efficient.

All the enzymatic assays were performed in a similar way to that described in the 2.3.1. section but using the following operational conditions: 50 g of non-exploded or exploded kraft pulps, 40°C, 2 hours, pH 6 (phosphate buffer, 100 mM), 10% consistency, 17.5 UA/ g dry pulp, 1.5% acetosyringone, 6 Kg/cm² of oxygen pressure and a few drops of 0.05% Tween 80. Controls without the addition of laccase nor mediator in the enzymatic treatment were performed (control-buffer, named as -Lc).

2.4.2. Alkaline extraction (E) and hydrogen peroxide (P) bleaching stages

Conditions for the alkaline extraction were: 1.5 % NaOH, 5% consistency and 90 °C temperature for 120 min. Thereafter, pulps were washed, and a hydrogen peroxide bleaching stage was applied under the following conditions: 2 % H₂O₂, 1.5 % NaOH, 1 % DTPA, 0.2 % Mg₂SO₄, 5 % consistency and 90 °C for 90 min. Residual hydrogen peroxide was titrated in the bleaching effluent.

2.5. Pulps characterization

Unbleached pulps and pulps obtained after each stage of the bleaching sequence (LEP) were characterized in terms of their kappa number, viscosity, brightness and CIE $L^*a^*b^*$ and CIE L^*C^* coordinates, in conformity with the ISO 302, ISO 5351-2, ISO 2470 and T 527 standards, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of *Hesperaloe funifera*

High contents of ash, ethanol extractives and hot water extractives were measured in *H. funifera* (5.2%, 3.1% and 15.9% respectively). These large amounts of extractives indicate a reduction in pulping yield. However, the lower lignin content detected for this material (9.4% klason lignin and 3.6% acid soluble lignin), compared to other non-wood and wood materials, could make the pulping easier and compensate for the expected low yield.

The biometric analysis shows that *H. funifera* has longer and thinner fibers (4.2 mm long and 7.2 μm wide) than other non-wood materials, such as cotton linters (3.5 mm and 21 μm), sisal (3.0 mm and 17 μm) or wheat straw (1.5 mm and 13 μm) (Fairbank and Detrick 2000), and also compared to woody species such as *Picea abies* (3.5 mm and 36 μm), *Pinus taeda* (4.0 mm and 43 μm) or *Eucalyptus saligna* (1.0 mm and 19 μm) (McLaughlin and Schuck 1991). *H. funifera*'s relatively significant slenderness (L/D ratio), compared to other raw materials, could provide more inter-fiber bonding and increased paper strength.

3.2. Steam explosion treatment

H. funifera samples were steam exploded under two different sets of conditions; and the most severe treatment resulted in a reduction of the yield (Table 1). These results are consistent with those found by other authors (Al-Dajani et al. 2009; Li et al. 2010), who report that the amount of hemicelluloses dissolved in the liquid fraction was larger with longer treatments, decreasing the yield of the process. The yield obtained for *H. funifera* when the SE2 treatment was carried out was lower than that obtained when

E. globulus was subjected to the same steam explosion treatment (62.5% vs 79.3%) (Martin-Sampedro et al. 2011a). This finding is likely to be the result of a higher content of hot water extractives when using *H. funifera* (15.9% vs 1.8% with *E. globulus*).

The water retention capacity could provide information about changes in the internal structure of the material and correlates well with its accessibility to chemicals. As it can be observed in Table 1, the non-exploded *H. funifera* sample showed a high water retention capacity (267g of water per 100g of dry sample). If this value is compared with those reported for *E. globulus* in a previous study (Martin-Sampedro et al. 2011a), a big difference is evident: 65g of water per 100g of non-exploded chips and 272g of water per 100 g of wood after the same steam explosion treatment as the one used in SE2. This finding suggests that the accessibility of non-exploded *H. funifera* is similar to that of exploded *E. globulus* after a pre-extraction and 2 cycles of steam explosion, each 10 and 3 minutes long (183°C). These results can be attributed to the more porous and readily accessible tissue structure of non-wood raw materials (Alaejos et al. 2004; Sanchez et al. 2011).

Furthermore, both steam explosion pretreatments meant an increase in the water retention capacity of *H. funifera*. Table 1 shows that, as the severity factor of the treatment grows, the water retention capacity of the sample increases too, reaching values of 359 and 434 g of water per 100 g of dry sample with SE1 and SE2, respectively.

3.3. Biopulping

Non-exploded (HP) and exploded (SE1 and SE2) *H. funifera* samples were subjected to a biopulping process consisting of a laccase mediator system (LMS) treatment followed by kraft pulping.

Figure 1 shows the total and the screened yield obtained during the kraft pulping of each sample. Both yields were similar because all pulps had low reject contents (around 1%). Thus, the removal of extractives during the steam explosion pre-treatment increased the relative cellulose content before pulping and brought about an increase in both yields in the exploded samples (SE1 and SE2). However, if the yield of the steam explosion pre-treatment is taken into account, the overall yield for HP, SE1 and SE2

was 37%, 36% and 29%, respectively (including both the kraft yield showed in figure 1 and the steam explosion yield). No other significant differences have been observed in kraft yields.

The quality of the obtained pulps can be evaluated from Figure 2, which shows the kappa number and the viscosity of the pulps. A reduction in the kappa number, compared to non-exploded pulps, was evident when the steam explosion was performed prior to kraft pulping. Moreover, this reduction was accentuated when the severity of the treatment increased (17.8% and 28.4% for SE1 and SE2 respectively). Therefore, the exploded material cooked faster and more efficiently than the untreated material, so that the cooking time or the cooking temperature could be reduced obtaining a pulp of similar characteristics (kappa number and viscosity) and reducing the energy consumption. However, the kappa number reduction with the SE2 pre-treatment using *E. globulus* (67.8%) (Martin-Sampedro et al. 2011c), was far greater than that obtained for *H. funifera*. This finding could be explained considering that non-exploded *H. funifera* already has a readily accessible tissue structure (as the water retention capacity showed) and an increase in this accessibility did not mean an improvement in reagent diffusion as that of *E. globulus*. Nevertheless, pre-treatment of *H. funifera* by means of steam explosion was associated to more delignification during kraft pulping than reported by Sanchez et al. (2011), who tested other pre-treatments, such as autohydrolysis and acid hydrolysis, preceding soda-anthraquinone pulping.

On the other hand, a similar reduction in the kappa number was observed when non-exploded *H. funifera* was subjected to enzymatic treatment. This reduction was a consequence of the buffer treatment at 40°C and not a result of the LMS effect, since no significant differences in delignification were observed when the LMS was incorporated. Therefore, the increase in delignification that accompanied the use of steam explosion or enzymatic pre-treatments is likely to be caused by the removal of extractives during steam/water treatment at high or moderate temperatures (183°C during few minutes in SE or 40°C during 5 hours in enzymatic treatment). When both treatments were performed sequentially, the delignification observed after kraft pulping reached even higher levels, with the more intensive steam explosion leading to more delignification. However, as it has been mentioned above, delignification levels with the addition of LMS in the enzymatic treatment were not higher than those observed when only buffer was added. Furthermore, the addition of LMS in non-exploded samples

(HP) caused an increase in the kappa number, versus control-buffer. This observation could be evidence of grafting of the LMS onto the pulp fiber (Dyer and Ragauskas 2004). Improving the delignification rate with the LMS pre-treatment requires further experiments to determine the optimal operational conditions (laccase dose, treatment time, etc.)

The steam explosion pre-treatment was associated to a decrease in the viscosity of the obtained pulps (Figure 2.b) due to fiber degradation. This effect was more pronounced when the severity of the treatment increased. However, the degradation of the fibers was not as intense as that reported when either autohydrolysis or acid hydrolysis was performed before soda-anthraquinone pulping (Sanchez et al. 2011). On the other hand, the enzymatic treatment did not cause a significant variation of the pulp viscosity.

The chemical consumption during kraft pulping was evaluated by measuring the residual active alkali (AA) and sulfidity (S) in the black liquors (Table 2). The use of the steam explosion pretreatment was associated to an increase in the residual AA (4.0, 4.6 and 5.4 for HP, SE1 and SE2 control samples respectively), which means that chemical consumption decreases (NaOH and Na₂S) as the severity of the steam explosion increases. This is likely the result of the removal of hemicelluloses, which during the kraft pulping process are degraded to carboxylic acids that consume significant amounts of alkali (San Martin et al. 1995). On the other hand, the addition of a LMS treatment increased the consumption of Na₂S (reduction in residual sulfidity: 17, 17.4 and 18.0 for HP, SE1 and SE2 laccase samples, compared to around 23 for control and control-buffer samples). A similar effect has been observed by Martin-Sampedro et al. (2011c), who introduced SE and LMS pre-treatments with a high laccase dose (30 UA/g) before kraft pulping of *E. globulus*. However, the residual AA showed that the total chemical consumption did not varied significantly with the addition of the LMS treatment (Table 2).

3.4. Biobleaching

A biobleaching process consisting of a laccase mediator system (LMS) treatment, followed by a TCF bleaching sequence (alkaline extraction plus hydrogen

peroxide bleaching), was applied to the exploded and non-exploded *H. funifera* kraft pulps.

In Figure 3, the kappa number and viscosity of the pulps after each stage of the LEP bleaching sequence are showed. For all pulps assayed, a reduction of the kappa number was observed after each stage, while the viscosity remained approximately constant during the whole bleaching process. Furthermore, in all pulps, the LMS treatment resulted in an even higher delignification rate without decreasing the pulp viscosity. This finding reflects a significant biodelignification of *H. funifera* without degradation of carbohydrate chains, which is consistent with results reported by other authors that used eucalyptus (Eugenio et al. 2010; Oudia et al. 2008) and flax fibers (Fillat et al. 2010).

As described above, the steam explosion pre-treatment resulted in a lower kappa number of unbleached pulp, compared to samples without steam explosion, as well as a slight degradation of the fibers. Comparing the two modalities of steam explosion pre-treatment applied (SE1 and SE2), a more intensive steam explosion led to more intense delignification during the LEP sequence. This finding is in agreement with that reported by Josefsson et al. (2002) after chemical bleaching of aspen exploded pulps. Reductions in the kappa number of 48.1% and 53.1% were achieved for SE2-Lc (control without LMS) and SE2-L (biotreated) samples, respectively, while the reductions in non-exploded samples were 36.6% and 42.4%, for HP-Lc and HP-L, respectively. Therefore, the addition of a steam explosion pre-treatment prior to kraft pulping improved both the bleaching and the biobleaching of *H. funifera*. Similar results were found by Martin-Sampedro et al. (2011b) when the same steam explosion pre-treatment and bleaching sequence were carried out with *E. globulus*, obtaining a delignification of 41.7% and 54.5% for control and biobleached exploded pulps, respectively.

Another goal of this research was to evaluate changes in optical properties. Figure 4 shows the evolution of brightness throughout the bleaching sequence and the change in color coordinates (CIE $L^*a^*b^*$ and CIE L^*C^*) before and after the bleaching. An increase in brightness was observed after each stage in the LEP sequence, with the largest increase occurring during the hydrogen peroxide stage (P), as expected. When a LMS treatment was applied, higher brightness values were reached in all pulps, therefore, it was concluded that the LMS treatment did boost the bleaching process for

all the *H. funifera* pulps assayed. Similar advantages of LMS treatments have been found by other authors using different raw materials (Eugenio et al. 2010; Fillat et al. 2010; Vivekanand et al. 2008).

Comparing non-exploded and exploded bleached pulps, higher brightness values were found for exploded pulps. When the severity of the steam explosion increased (SE2), the final brightness was even higher (67%ISO). However, besides brightness, the color appearance of paper is also an important parameter in many different applications and good white base colors are necessary where products are to be dyed, printed, or otherwise colored. For this reason, CIE $L^*a^*b^*$ and CIE L^*C^* color coordinates were measured in non-exploded and exploded pulps before and after the biobleaching sequence (Figures 4b and 4c). A reduction in the a^* coordinate values (which indicate the position between red and green) was observed at the end of the sequence with all samples, being the a^* coordinate values for bleached pulps very close to the ideal neutral value (0). However, the b^* coordinate (position between yellow and blue) for non-exploded pulps hardly changed during the bleaching process, and even increased (more yellow) for SE1 bleached pulps. In contrast to this, when a more intensive steam explosion pre-treatment was carried out (SE2), the b^* coordinate decreased during the bleaching process. Thus, chroma (C^* coordinate), which indicates the distance from a perfectly neutral color, decreased for SE2 bleached pulps but remained approximately constant for SE1 and HP samples. As far as lightness is concerned, the L^* coordinate values increased for all pulps after biobleaching. Based on these last results, it was concluded that the most intensive steam explosion pre-treatment (SE2) did improve the optical properties, not only increasing brightness and lightness, but also reducing the color of the *H. funifera* biobleached pulp. Comparable improvements have been found by Martin-Sampedro et al. (2011b) when a similar steam explosion and bleaching sequence was performed using *E. globulus*. However, the mildest steam explosion pre-treatment applied in our experiments (SE1) did not improve the pulp color compared to non-exploded bleached pulps.

Another advantage of the steam explosion pre-treatment was the reduction of hydrogen peroxide consumption during the bleaching process (Table 3). As it can be observed, a more intensive steam explosion pre-treatment resulted in less hydrogen peroxide consumed in the whole process. Thus, the SE2 pre-treatment was associated to a reduction in the use of chemicals of up to 24.6% during biobleaching (92.7% vs

68.1% for HP-L and SE2-L respectively). A possible explanation of this effect is that the steam explosion removes substances that compete with lignin for the hydrogen peroxide. This effect has already been observed by Martin-Sampedro et al. (2011b) in the biobleaching of *E. globulus* kraft pulp and it has been attributed to the low hexenuronic acid content of exploded pulps. However, when a LMS pretreatment was added to the bleaching sequence, slightly more hydrogen peroxide was consumed with all *H. funifera* pulps, in contrast to what has been reported by other authors who have used wood raw materials (Eugenio et al. 2010; Martin-Sampedro et al. 2011b; Valls et al. 2009). Nevertheless, it should be taken into account that, in these studies, the LMS pre-treated pulps had lower kappa numbers and higher brightness, and therefore, if compared at the same delignification and brightness level, the chemical consumption of the LMS pre-treated samples would probably be lower than that of the control pulps.

4. Conclusions

The steam explosion pre-treatment increased the delignification rate during the subsequent kraft pulping of *H. funifera*, providing kraft pulps with lower kappa numbers (or alternatively reducing the cooking time) and higher viscosity than those reported with autohydrolysis and acid hydrolysis pre-treatments. Furthermore, a reduction in the chemical consumption was observed. The addition of a LMS pre-treatment before kraft pulping did not improve delignification in the assayed conditions. However, the addition of a LMS pre-treatment as the first stage in the bleaching sequence resulted in smaller kappa numbers and an increase in brightness in bleached pulps. These improvements in biobleaching were boosted when a steam explosion pre-treatment preceded the kraft pulping, reducing also the color of the pulp and consumption of hydrogen peroxide during the bleaching process.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation for funding this study via the Projects CTQ 2006-00385 and CTQ 2009-11268 and the FPI fellowship (BES2007 – 14528).

References

- Ahvazi B, Radiotis T, Bouchard J, Goel K (2007) Chemical pulping of steam-exploded mixed hardwood chips. *J Wood Chem Technol* 27(2):49-63
- Alaejos J, López F, Eugenio ME, Fernández M (2004) Non-wood raw materials for pulp and paper making. A review. *Afinidad* LXI, 513:400-410
- Al-Dajani WW, Tschirner UW, Jense T (2009) Pre-extraction of hemicelluloses and subsequent kraft pulping. Part II: Acid- and autohydrolysis. *Tappi J* 30-37
- Burton SW (2001) Low energy thermomechanical pulpin process using an enzyme treatment between refining zones. Patent US 6267841
- Eugenio ME, Santos SM, Carbajo JM, Martín JA, Martín-Sampedro R, González AE, Villar JC (2010) Kraft pulp biobleaching using an extracellular enzymatic fluid produced by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresour Technol* 101:1866–1870
- Dyer TJ, Ragauskas AJ (2004) Laccase: a harbinger to kraft pulping. *ACS Sym. Ser.* 889:339-362
- Fairbank M, Detrick R (2000) Hesperaloe funifera – an excellent reinforcement fiber for mechanical paper grades. *Tappi J.* 1-5
- FAO. <http://faostat.fao.org>. Accessed May 2011
- Fillat A, Colom JF, Vidal T (2010) A new approach to the biobleaching of flax pulp with laccase using natural mediators. *Bioresour Technol* 101:4104-4110
- Jacobs-Young C, Heitmann JA, Venditti RA (1998) Conventional kraft pulping using enzyme pre-treatment technology: role of chip thickness, specie and enzyme combinations. *AIChE Annual Meeting on the Innovative Advances in the Forset Products Industries*. Los Angeles (EEUU) 94(319):1-15.
- Josefsson T, Lennholm H, Gellerstedt G (2002) Steam explosion of aspen wood. Characterization of reaction products. *Holzforschung* 53(3):289-297
- Li H, Saeed A, Jahan MS, Ni Y, Van Heiningen A (2010) Hemicellulose removal from hardwood chips in the pre-hydrolysis step of the kraft-based dissolving pulp production process. *J Wood Chem Technol* 30:48-60

- Maijala P, Kleen M, Westin C, Poppius-Levlin K, Herranen K, Lehto JH, Reponen P, Mäentausta O, Mettälä A, Hatakka A (2008) Biomechanical pulping of softwood with enzymes and white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Enzyme Microb Tech* 43:169-177
- Martin-Sampedro R, Eugenio ME, Revilla E, Martin JA, Villar JC (2011a) Integration of kraft pulping on a forest biorefinery by the addition of a steam explosion pretreatment. *BioResources* 6(1):513-528
- Martin-Sampedro R, Eugenio ME, Villar JC (2011b) Biobleaching of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Comparison between pulps obtained from exploded and non-exploded chips. *Bioresour Technol* 102:4530–4535
- Martin-Sampedro R, Eugenio ME, Carbajo JM, Villar JC (2011c) Combination of steam explosion and laccase-mediator treatments prior to *Eucalyptus globulus* kraft pulping. *Bioresour Technol* 102:7183-7189
- McLaughlin SP (2000) Properties of paper made from fibers of *Hesperaloe funifera* (Agavaceae). *Economic Botany* 54(2):192-196
- McLaughlin SP, Schuck SM (1991) Fiber properties of several species of Agavaceae from the Southwestern United States and Northern Mexico. *Economic Botany* 45(4):480-486
- Moldes D, Díaz M, Tzanov T, Vidal T (2008) Comparative study of the Efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Bioresour Technol* 99:7959-7965
- Oudia A, Queiroz J, Simoes R (2008) Potential and limitation of *Trametes versicolor* laccase on biodegradation of *Eucalyptus globulus* and *Pinus pinaster* kraft pulp. *Enzyme Microb Technol* 43:144–148
- Overend R P, Chornet E (1987) Fractionation of lignocellulosics by steamaqueous pretreatments. *Philos Trans R Soc London*. A321, 523-536
- Pere J, Ellmen J, Viikari L (2005) Process for preparing mechanical pulp. Patent WO/2005/056915

- Qin M, Xu Q, Fu Y, Li Z (2006) Process for enzyme treating before pulping by plant fibre raw material. Patent Number: CN1793488-A
- Ragauskas AJ, Nagy M, Kim DH, Eckert CA, Hallett JP, Liotta CL (2006) From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. *Indus Biotech* 2(1): 55-65
- Ramos J, Rojas T, Navarro F, Davalos F, Sanjuan R, Rutiaga J, Young RA (2004) Enzymatic and fungal treatments on sugarcane bagasse for the production of mechanical pulps. *J Agri Food Chem.* 52:5057-5062
- Revilla E, Eugenio ME, Martin-Sampedro R, Villar JC (2010) Using wood and non-wood fibers as a reinforcement to produce recycled paper from newspapers. *Proceedings of VI Iberoamerican Congress on Pulp and Paper Research (CIADICYP)*, 329
- San Martin R, Perez D, Briones R (1995) Simultaneous production of ethanol and kraft pulp from pine (*Pinus radiata*) using steam explosion. *Bioresource Technol* 53:217-223
- Sanchez R, Rodriguez A, Navarro E, Conesa JA, Jimenez L (2010a) Use of *Hesperatloe funifera* for the production of paper and extraction of lignin for synthesis and fuel gases. *Biomass Bioenerg* 34:1471-1480
- Sanchez R, Rodriguez A, Requejo A, Ferrer A, Navarro E (2010b) Soda pulp and fuel gases synthesis from *Hesperatloe funifera*. *Bioresour Technol* 101:7032-7040
- Sanchez R, Rodriguez A, Garcia JC, Rosal A, Jimenez L (2011) Exploitation of hemicellulose, cellulose and lignin from *Hesperatloe funifera*. *Bioresour. Technol.* 102(2):1308-1315
- Valls C, Molina S, Vidal T, del Río JC, Colom JF, Martínez AT, Gutiérrez A, Roncero MB (2009) Influence of operation conditions on laccase-mediator removal of sterols from eucalypt pulp. *Process Biochem* 44:1032–1038
- Van Heiningen A (2006) Converting a kraft pulp mill into an integrated biorefinery. *Pulp Pap Can.* 107(6):141-146

- Viikari L, Ranua M, Kantelinen A, Linko M, Sundquist J (1986) Biobleaching with enzymes. Proceedings of the Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, Stockholm, 67–69
- Vivekanand V, Dwivedi P, Sharma A, Sabharwal N, Singh RP (2008) Enhanced delignification of mixed wood pulp by *Aspergillus fumigatus* laccase mediator system. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2799-2804
- Wong A, McLaughlin SP (2000) Alkaline sulphite pulping of Hesperaloe, and aridzone native fibre plant from Northern Mexico. Proc Tappi Pulping Conference, Boston. AK19833W
- Zhao J, Li X, Qu Y, Gao P (2002) Xylanase pretreatment leads to enhanced soda pulping of wheat Straw. *Enzyme Microb Tech* 30:734-740

Figure Caption

Fig. 1 (a) Total and (b) screened kraft yields for non-exploded (HP) and exploded (SE1 and SE2) pulps after LMS pre-treatment (laccase); compared with a control without the addition of LMS in the enzymatic treatment (control-buffer) and a control without the enzymatic treatment step (control)

Fig. 2 (a) Kappa number and (b) viscosity of non-exploded (HP) and exploded (SE1 and SE2) pulps after LMS pre-treatment (laccase); compared with a control without the addition of LMS in the enzymatic treatment (control-buffer) and a control without the enzymatic treatment step (control)

Fig. 3 (a) Kappa number and (b) viscosity after biobleaching of non-exploded (HP) and exploded (SE1 and SE2) pulps. Controls without addition of LMS (-Lc) were included. The biobleaching sequence consisted of laccase stage (L), alkaline extraction stage (E) and hydrogen peroxide stage (P)

Fig. 4 Optical properties after biobleaching of non-exploded (HP) and exploded (SE1 and SE2) pulps: (a) brightness evolution during the bleaching sequence; where L: laccase stage, E: alkaline extraction stage and P: hydrogen peroxide stage; (b) CIE $L^*a^*b^*$ coordinates and (c) CIE L^*C^* coordinates for unbleached (black symbols) and biobleached (grey symbols) pulps

Figure 1

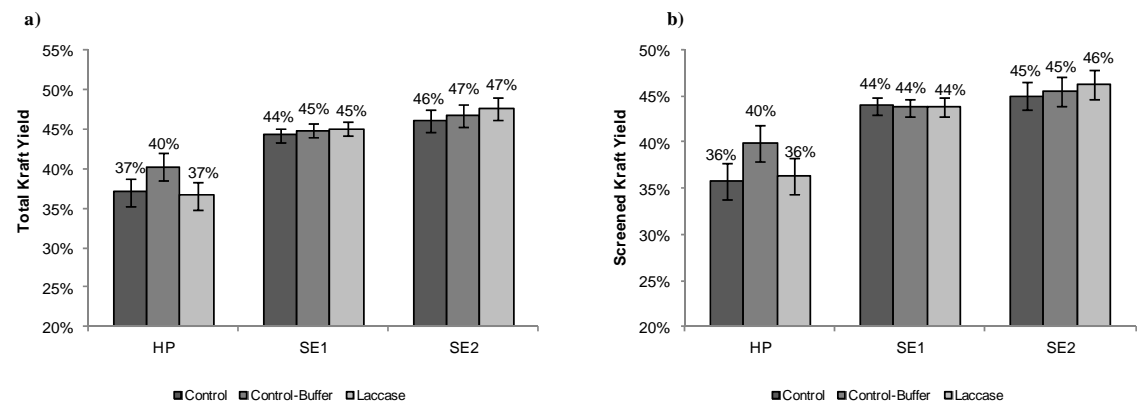


Figure 2

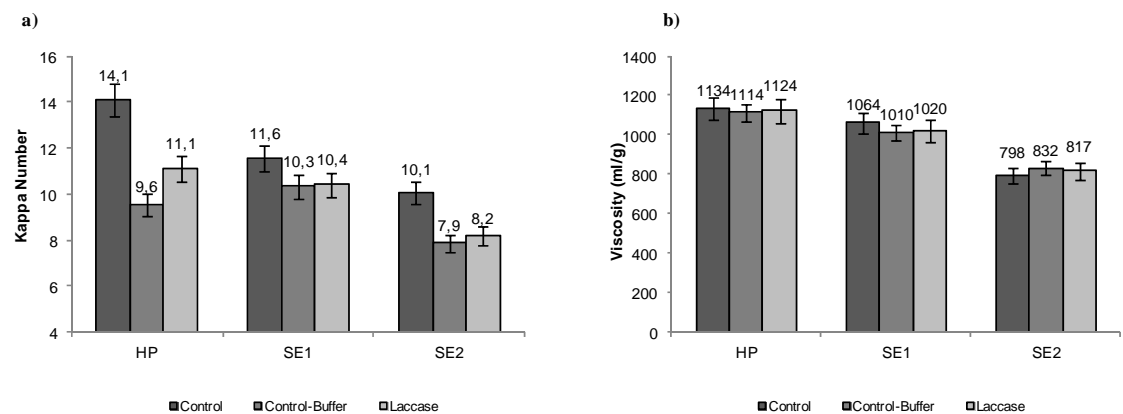


Figure 3

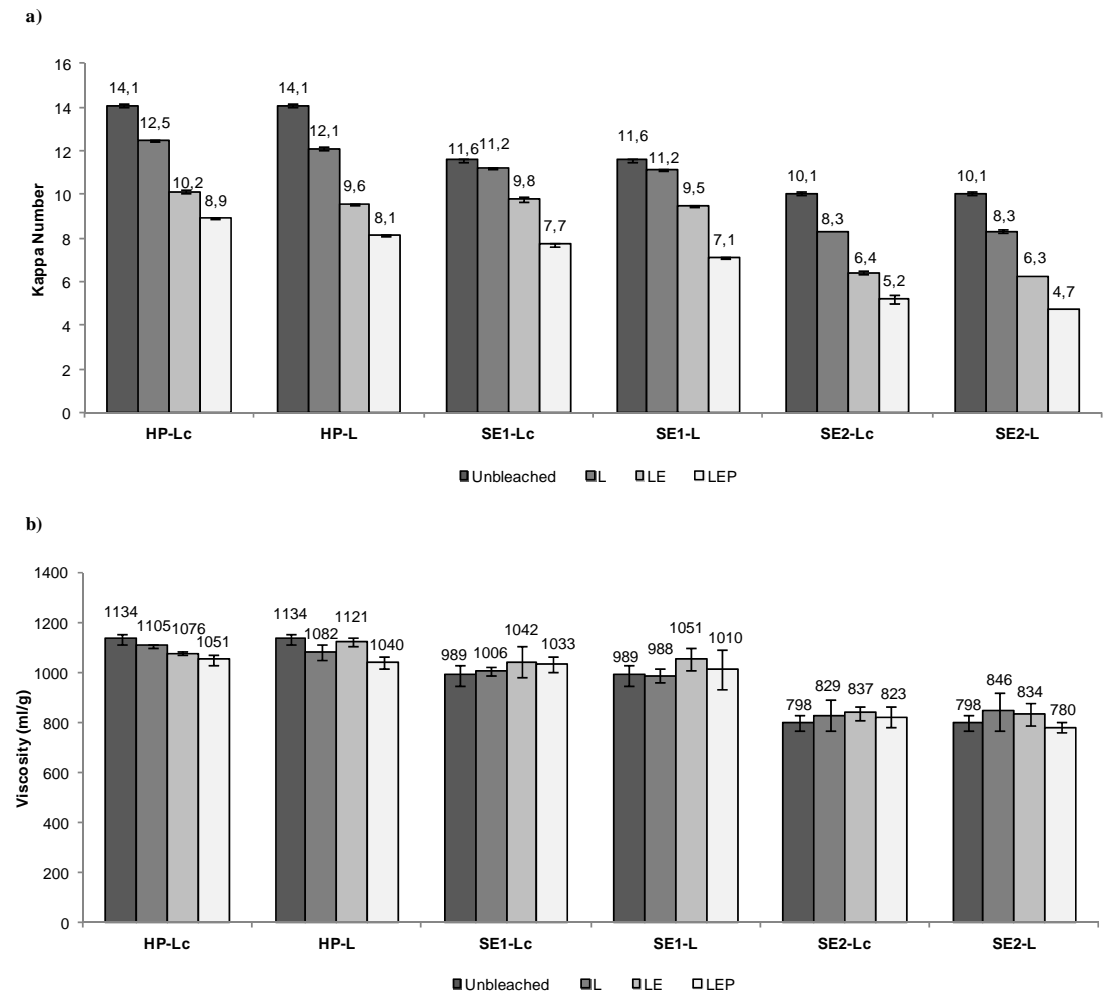


Figure 4

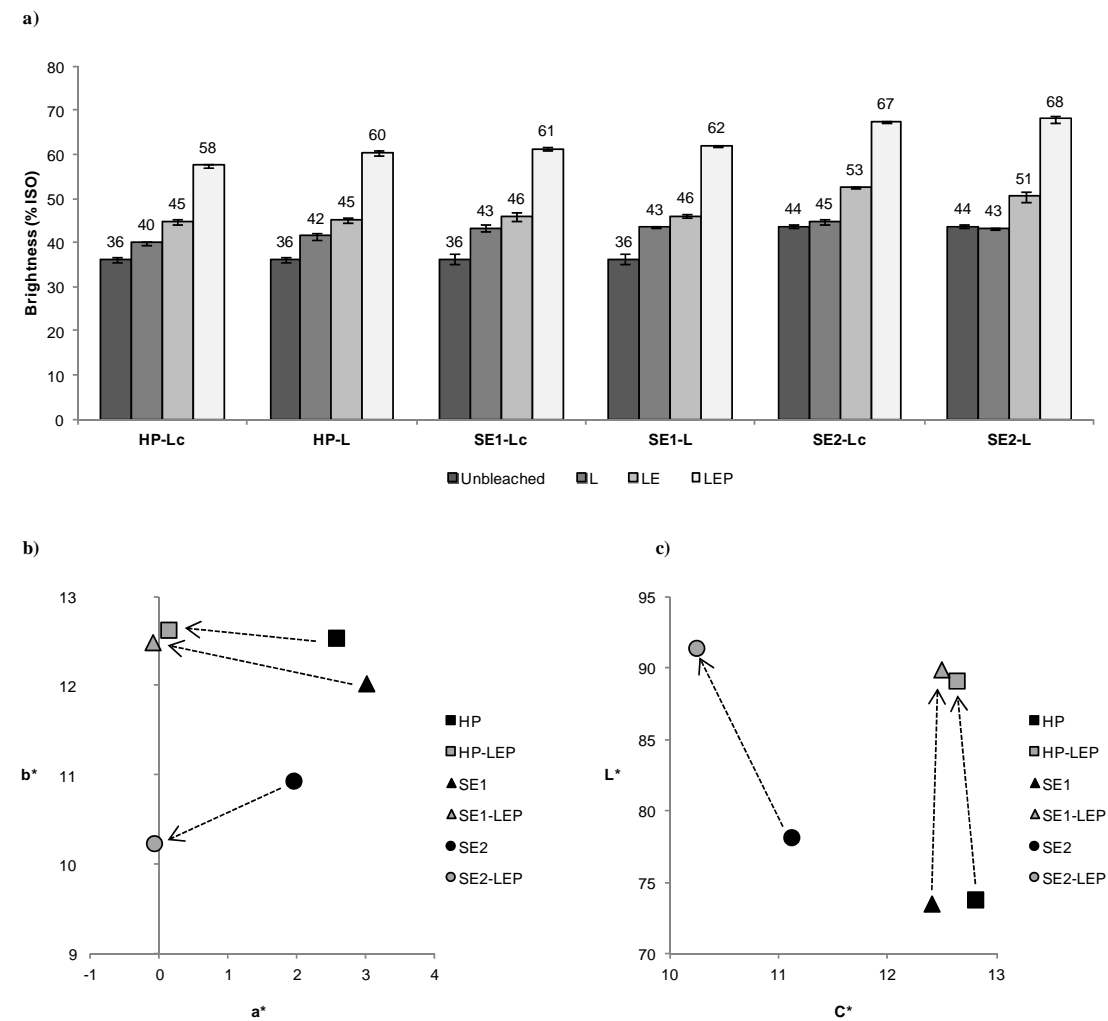


Table 1. Steam explosion conditions, process yields and water retention capacity of the samples.

	HP	SE1	SE2
Pre-extraction	No	Yes	Yes
1st cycle (min)	-	3	10
2nd cycle (min)	-	-	3
Severity S0	-	2.92	3.56
Yield (%)	-	81.9	62.5
Water retention ^a	267	359	434

^aWater retention capacity as grams of water per 100 grams of dry sample

Table 2. Residual active alkali (AA) and sulfidity (S) in the black liquors.

Sample	AA	S
HP - Control	4.0	23.1
HP - Control-Buffer	4.9	24.4
HP - Laccase	4.7	17.0
SE1 - Control	4.6	25.0
SE1 - Control-Buffer	3.9	20.3
SE1 - Laccase	3.8	17.4
SE2 - Control	5.4	19.8
SE2 - Control-Buffer	4.5	22.1
SE2 - Laccase	5.1	18.0

Table 3. Hydrogen peroxide consumption (%) measured in the different bleaching effluents after the LEP sequence.

Sample	H ₂ O ₂ consumption (%)
HP-Lc	90.3
HP-L	92.7
SE1-Lc	87.5
SE1-L	88.0
SE2-Lc	66.1
SE2-L	68.1

